

biologia plantarum

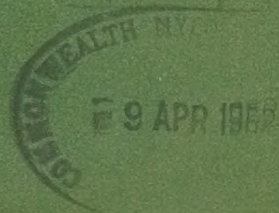
ACADEMIA SCIENTIARUM BOHEMOSLOVENICA

TOMUS I

4

PRAHA 1959

	NSP	
☒	RAM	☒
	MM	



biologia plantarum

Časopis pro experimentální botaniku
Journal for Experimental Botany
Журнал экспериментальной ботаники
Zeitschrift für experimentelle Botanik

Hlavní redaktor akademik B. Němec

Redakční rada: C. Blattný, člen korespondent ČSAV, J. Brčák, I. Cetl, A. Činčerová, I. Hršel, K. Hrubý, J. Kloz, M. Luxová, akademik S. Prát, V. Rypáček, B. Slavík, výkonný redaktor, M. Sosna

Za překlady zodpovídají: G. Färber, Z. Landa, A. Ridesová, J. B. Rodendorfová, M. Vilbrová

Editor-in-Chief: B. Němec, Member of the Czechoslovak Academy of Sciences

Editorial Board: C. Blattný, Corresponding Member of the Czechoslovak Academy of Sciences, J. Brčák, I. Cetl, A. Činčerová, I. Hršel, K. Hrubý, J. Kloz, M. Luxová, S. Prát, Member of the Czechoslovak Academy of Sciences, V. Rypáček, B. Slavík, Editorial Secretary, M. Sosna

Foreign Language Editors: G. Färber, Z. Landa, A. Ridesová, J. B. Rodendorfová, M. Vilbrová

Главный редактор академик Б. Немец

Редакционный совет: член-корреспондент ЧСАН Ц. Блаттны, Я. Брчак, И. Гршел, К. Грубы, И. Клоз, М. Луксова, академик С. Прат, В. Рыпачек, Б. Славик, ответственный редактор, М. Сосна
И. Цетл, А. Чинчерова

Переводы на иностранные языки: М. Вильброва, З. Ланда, А. Ридесова, Е. Б. Родендорф, Г. Фербер

Hauptredakteur: B. Němec, Mitglied der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften

Redaktionsrat: C. Blattný, Korrespondierendes Mitglied der Tschsl. Akademie d. Wissenschaften, J. Brčák, I. Cetl, A. Činčerová, I. Hršel, K. Hrubý, J. Kloz, M. Luxová, S. Prát, Mitglied der Tschsl. Akademie d. Wissenschaften, V. Rypáček, B. Slavík, Redaktionssekretär, M. Sosna

Redaktion der fremdsprachigen Übertragungen: G. Färber, Z. Landa, A. Ridesová, J. B. Rodendorfová, M. Vilbrová

Dry Matter Production and Growth in Length of Overground Parts of *Carex humilis* LEYSS

MILENA SMETÁNKOVÁ

Geobotanical Section of the Department of Botany, Faculty of Biology,
Charles University, Praha

Received February 23, 1959

Souhrn

Na třech mikroklimaticky zřetelně odlišných a měřením charakterisovaných stanovištích (step, skalní step, les) v Českém krasu (Velká hora u Karlštejna, okr. Beroun, střední Čechy) byla porovnávána produkce sušiny a délkový růst nadzemní části ostřice nízké (*Carex humilis* LEYSS.) v závislosti na hlavních stanovištních činitelích.

Produkce sušiny nadzemní části jednotlivých rostlin *C. h.* byla nejvyšší na stepi, kde ostřice nízká též silně odnožovala a hojně kvetla. Její procento pokryvnosti bylo však na tomto stanovišti ze všech tří srovnávaných nejnižší. V lese a na skalní stepi, kde je ostřice nízká ve svém vývinu omezena (na skalní stepi nízká produkce jednotlivých rostlin, v lese slabé odnožování a kvetení), byla zjištěna pokryvnost daleko vyšší než na stepi. O rozšíření sledované rostliny tedy zřejmě nerozhodují jen klimatické a edafické podmínky stanovištní, ale současně i další faktor, pravděpodobně konkurenční.

Z porovnání přírůstkové křivky (na základě délkových měření, protože délka nadzemní části — tj. v případě *C. h.* délka listů — je počátkem vegetačního období přímo úměrná váze sušiny) se změnami průměrných teplot vzduchu vyplývá, že v počátečním období růstu je patrně limitujícím faktorem růstu teplota.

Ve vegetačních pokusech s přesazenými a vyšetými rostlinami bylo možno zčásti oddělit vliv jednotlivých faktorů na růst *C. h.*; z výsledků je možno uzavřít, že na délku nadzemní části, a tím i na produkci sušiny má u *C. h.* vliv především vodní faktor. Vliv intenzity světla ani chemického složení půdy na růst nebyl v daných podmínkách zjištěn.

Rozdíly růstu, pozorované v přirozených podmínkách, závisí tedy pravděpodobně hlavně na vodním režimu stanovišť, v případě většího růstu ostřice nízké v lese. Nižší vzrůst ostřice nízké na skalní stepi ve srovnání se stepí se nepodařilo objasnit pokusem, protože podmínky těchto stanovišť nejsou reprodukovatelné; z výsledků měření na přirozených stanovištích vyplývá možný vliv extrémnějšího mikroklimatu skalní stepi.

Summary

1. The relative suitability of three natural habitats of *Carex humilis* was determined on the basis of dry matter production of individual plants at the end of the growing period. In the habitat which was found to be the most favourable from this point of view the lowest degree of ground cover by the plant concerned was also recorded. It is therefore possible to assume that it is not only factors connected with the habitat that influence the occurrence of *Carex humilis* under the given conditions.

2. A comparison of the course of the growth curve with changes in air temperature indicates that, for the initial growing period when soil humidity is adequate, temperature is probably the limiting factor.

3. The results of the cultivation experiments lead to the conclusion that the water factor has the strongest influence on growth in length and on increase in dry weight of the overground parts of *Carex humilis*. Under the conditions obtaining in these experiments the influence of light intensity and of the chemical composition of the soil on growth were not found.

Introduction

The sedge *Carex humilis* LEYSS. (hereafter referred to as *C. h.*) is usually described in the floras as a species growing in predominantly steppe habitats on a limestone substratum, although some more detailed studies and a number of herbarium specimens (Botanical institute of Charles University, Praha) provide evidence of its occurrence under considerably divergent ecological conditions. This fact also appears in the phytocenological evaluation of the plant: in the majority of xerothermic grass communities it is only included as a subsidiary species (BRAUN-BLANQUET 1938, KLIKA 1939). Papers even exist which refer to the occurrence of *C. h.* in communities of definitely "acidiphile" plants, in soil with a low CaCO_3 content (DRUDE 1887) and in humid, shady habitats (SMIRNOV 1923). More recently the considerable ecological range of *C. h.* has been demonstrated by KRAUSE (1940).

The papers referred to give data on the occurrence of the plant, in some cases supplemented by measurements of biotope factors (DRUDE 1887, KRAUSE 1940) or by experimental sowing (KRAUSE 1950); the aim of the present work is, therefore, to augment existing knowledge of *C. h.* by a study of some of its life processes, especially the dry matter production and growth in length in relation to the main biotope factors during one year, and by cultivation experiments.

Biotores, Materials and Methods

Measurements in natural biotores

Field investigation was carried out in the Velká hora reservation (410 m. above sea level), in the Bohemian Kras (Central Bohemian xerothermic area near Beroun. Geological substratum of Silurian and Devonian limestones). This area had already been investigated as regards its

С НОВЫМ ГОДОМ, С НОВЫМ СЧАСТЬЕМ

поздравляет читателей и друзей редакция журнала BIOLOGIA PLANTARUM. Выражаем глубокую благодарность всем биологам, содействующим хорошему приему нашего журнала.



J. Lukavský

HAPPY CHRISTMAS AND A PROSPEROUS NEW YEAR

to all readers and friends of BIOLOGIA PLANTARUM from the Editorial Board. We thank all biologists who have helped towards the favourable reception of our journal.

Dr. B. SLAVÍK

Prof. Dr. B. NĚMEC

**biologia
plantarum**

Адрес редакции: Биологический институт ЧСАН, На цвижиšti 2, Прага-Дейвице.

Editorial address: Biologický ústav ČSAV, Na evižišti 2, Praha-Dejvice.

BIOLOGIA PLANTARUM (журнал экспериментальной ботаники) публикует на главных языках мира оригинальные научные работы и краткие предварительные сообщения по вопросам физиологии, экспериментальной экологии, генетики, цитологии, экспериментальной морфологии, биохимии и патологии растений. В качестве предварительных сообщений принимаются рукописи размерами до двух страниц. Все работы посылаются с копией.

Адрес редакции: Д-р Богдан Славик, Биологический институт ЧСАН, На цвищишти 2, Прага-Дейвице.

Оформление работ и способ цитирования литературы как в данном выпуске. Перед каждой статьей помещается реферат на чешском языке, содержащий цель работы, краткое описание методики и материала, результаты и выводы.

BIOLOGIA PLANTARUM (Journal for Experimental Botany) publishes original scientific papers and short preliminary reports from the fields of plant physiology, experimental ecology, genetics, cytology, experimental morphology, biochemistry and pathology. Articles are published in the most important foreign languages. (Manuscripts of preliminary reports may be up to two pages in length.) All papers are to be sent with one copy.

Editorial address: Dr. Bohdan Slavík, Biologický ústav ČSAV, Na cvičišti 2, Praha-Dejvice.

Work submitted should be arranged and references should be indicated as in the articles in the present issue. A summary in Czech, written as a self-contained abstract (aim of the work, short account of methods and material, results and conclusion) will precede the text of each article.

1960

		ЯНВАРЬ JANUARY	ФЕВРАЛЬ FEBRUARY	МАРТ MARCH		
B		3 10 17 24 31	7 14 21 28	6 13 20 27	S	
П		4 11 18 25	1 8 15 22 29	7 14 21 28	M	
В		5 12 19 26	2 9 16 23	1 8 15 22 29	T	
С		6 13 20 27	3 10 17 24	2 9 16 23 30	W	
Ч		7 14 21 28	4 11 18 25	3 10 17 24 31	T	
П	1	8 15 22 29	5 12 19 26	4 11 18 25	F	
С	2	9 16 23 30	6 13 20 27	5 12 19 26	S	
		АПРЕЛЬ APRIL	МАЙ MAY	ИЮНЬ JUNE		
B		3 10 17 24	1 8 15 22 29	5 12 19 26	S	
П		4 11 18 25	2 9 16 23 30	6 13 20 27	M	
В		5 12 19 26	3 10 17 24 31	7 14 21 28	T	
С		6 13 20 27	4 11 18 25	1 8 15 22 29	W	
Ч		7 14 21 28	5 12 19 26	2 9 16 23 30	T	
П	1	8 15 22 29	6 13 20 27	3 10 17 24	F	
С	2	9 16 23 30	7 14 21 28	4 11 18 25	S	
		ИЮЛЬ JULY	АВГУСТ AUGUST	СЕНТЯБРЬ SEPTEMBER		
B		3 10 17 24 31	7 14 21 28	4 11 18 25	S	
П		4 11 18 25	1 8 15 22 29	5 12 19 26	M	
В		5 12 19 26	2 9 16 23 30	6 13 20 27	T	
С		6 13 20 27	3 10 17 24 31	7 14 21 28	W	
Ч		7 14 21 28	4 11 18 25	1 8 15 22 29	T	
П	1	8 15 22 29	5 12 19 26	2 9 16 23 30	F	
С	2	9 16 23 30	6 13 20 27	3 10 17 24	S	
		ОКТАБРЬ OCTOBER	НОЯБРЬ NOVEMBER	ДЕКАБРЬ DECEMBER		
B		2 9 16 23 30	6 13 20 27	4 11 18 25	S	
П		3 10 17 24 31	7 14 21 28	5 12 19 26	M	
В		4 11 18 25	1 8 15 22 29	6 13 20 27	T	
С		5 12 19 26	2 9 16 23 30	7 14 21 28	W	
Ч		6 13 20 27	3 10 17 24	1 8 15 22 29	T	
П		7 14 21 28	4 11 18 25	2 9 16 23 30	F	
С	1	8 15 22 29	5 12 19 26	3 10 17 24 31	S	

**biologia
plantarum**

BIOLOGIA PLANTARUM

TOMUS

1

ACADEMIA SCIENTIARUM BOHEMOSLOVENICA

PRAHA 1959



biologia plantarum

Časopis pro experimentální botaniku
Journal for Experimental Botany
Журнал экспериментальной ботаники
Zeitschrift für experimentelle Botanik

Hlavní redaktor akademik B. Němec

Redakční rada: C. Blattný, člen korespondent ČSAV, J. Brěák, I. Cetl, A. Činčerová, I. Hršel, K. Hrubý, J. Kloz, M. Luxová, akademik S. Prát, V. Rypáček, B. Slavík, výkonný redaktor, M. Sosna

Za překlady zodpovídají: G. Färber, Z. Landa, A. Ridesová, J. B. Rodendorfová, M. Vilbrová

Editor-in-Chief: B. Němec, Member of the Czechoslovak Academy of Sciences

Editorial Board: C. Blattný, Corresponding Member of the Czechoslovak Academy of Sciences, J. Brěák, I. Cetl, A. Činčerová, I. Hršel, K. Hrubý, J. Kloz, M. Luxová, S. Prát, Member of the Czechoslovak Academy of Sciences, V. Rypáček, B. Slavík, Editorial Secretary, M. Sosna

Foreign Language Editors: G. Färber, Z. Landa, A. Ridesová, J. B. Rodendorfová, M. Vilbrová

Главный редактор академик Б. Немец

Редакционный совет: член-корреспондент ЧСАН Ц. Блаттны, Я. Брчак, И. Гршел, К. Грубы, И. Клоз, М. Луксова, академик С. Прат, В. Рypачек, Б. Славик, ответственный редактор, М. Сосна И. Цетл, А. Чинчерова

Переводы на иностранные языки: М. Вильброва, З. Ланда, А. Ридесова, Е. Б. Родендорф, Г. Фербер

Hauptredakteur: B. Němec, Mitglied der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften

Redaktionsrat: C. Blattný, Korrespondierendes Mitglied der Tschsl. Akademie d. Wissenschaften, J. Brěák, I. Cetl, A. Činčerová, I. Hršel, K. Hrubý, J. Kloz, M. Luxová, S. Prát, Mitglied der Tschsl. Akademie d. Wissenschaften, V. Rypáček, B. Slavík, Redaktionssekretär, M. Sosna

Redaktion der fremdsprachigen Übertragungen: G. Färber, Z. Landa, A. Ridesová, J. B. Rodendorfová, M. Vilbrová

INDEX

BATYUK, V. P., RYBALKO, E. F., OKANENKO, A. S.: A Photoelectric Planimeter for Measuring Leaf Area	167
BENEŠ, K.: The Cytomorphological Effects of Low Temperatures Studied by Temperated Fixatives	93
BLATTNÝ, C.: <i>Anagallis arvensis</i> L. als Indikator der Anwesenheit von Viren aus der Gruppe der Samenlosigkeit (Akarpie) — Stolbur und Vergilbungskrankheiten . .	211
BLATTNÝ, C.: Modellstudien und Beobachtungen über die Gruppe der virösen Akarprien (Stolbur und Vergilbungen) an <i>Anagallis arvensis</i> L.	310
BRČÁK, J.: Transmission of Beet Mosaic Virus by the Green Peach Aphid Starved before Infection Feeding under Different Conditions of Air Humidity (Brief Comm)	330
ČATSKÝ, J.: The Role Played by Growth in the Determination of Water Deficit in Plants	277
FEDOROV, A. K.: Peculiarities of the Development of Alternatives in Relation to their Winter-Hardiness	295
GINTEROVÁ, A.: The Effect of Ethylene Chlorhydrin on the Carbohydrate Metabolism in Potatoes	258
HONČARIV, R.: Stimulation of the Growth of <i>Trifolium pratense</i> Following Exposure to Low Doses of Chronic Gamma Irradiation	205
HOŘAVKA, B.: Observation of IEP _M Values of Growing Points of Flower Buds of the Apple during the Period before their Morphological Differentiation	16
ЕРМОЛЬЕВ, Е., ПОЗДЕНА, Я.: Повышение титров сывороток при помощи иммунизации преципитат-антигеном из растительного материала	302
JERMOLJEV, E. see PRŮŠA, V.	
KREKULE, J., ULLMANN, J.: The Influence of Gibberellic Acid on the Growth of Over-ground Parts and Roots of Wheat, Lettuce and Oats	22
KUBÍN, Š.: Catalase Activity in Thermal Blue-gree Algae in Relation to Temperature	3
KUTÁČEK, M., ROKOSOVÁ, K., ŘETOVSKÝ, R.: A Study of Metabolism of Exogenous Tryptophane and β -Indoleacetic Acid in Extirpated Wheat Embryos	54
ЛАНДА, З.: Гамма-гексахлорциклопексан в качестве полиплоидогенного вещества	151
LIMBERK, J.: The Influence of Photoperiodicity on the Sexual Index in Hemp (<i>Cannabis sativa</i> L.)	176
LUŠTINEC, J.: The Effect of β -Indolebutyric Acid on Phosphatase and Catalase Activity in Grape Vine Cuttings	99
OKANENKO, A. S. see BATYUK, V. P.	
PLHÁK, F.: Der Einfluss der Dichte des Pflanzenbestandes auf Wachstum, Wasser-, Chlorophyll- und Phosphorgehalt in Weizen und Korn	248
POSPÍŠIL, F. see PRÁT, S.	
ПОЗДЕНА, Я. см. ЕРМОЛЬЕВ, Е.	
PRÁT, S., POSPÍŠIL, F.: Humic Acids with C ¹⁴	71
PRÁT, S., ŠESTÁK, Z.: Autotroph-heterotroph Relationships in Natural Waters	81
PROTSSENKO, A. E.: Electron Microscopy of the Aster Yellows Virus (<i>Leptomotopus callistephi</i> RYZHKOV)	187

PRŮŠA, V., JERMOLJEV, E., VACKE, J.: Oat Sterile-Dwarf Virus Disease	223
RAUŠER, V., TRNKA, A.: Untersuchungen über die durch Ultraschall hervorgerufenen Sofortveränderungen in der Zelle	63
ROKOSOVÁ, K. see KUTÁČEK, M.	
RYBÁLKO, E. F. see BATYUK, V. P.	
ŘETOVSKÝ, R.: Die Biotechnose beim Apfelbaum	31
ŘETOVSKÝ, R. see KUTÁČEK, M.	
SLADKÝ, Z.: The Effect of Extracted Humus Substances on Growth of Tomato Plants	142
SLADKÝ, Z.: The Application of Extracted Humus Substances to Overground Parts of Plants	199
SLADKÝ, Z., TICHÝ, V.: Application of Humus Substances to Overground Organs of Plants	9
SLAVÍK, B.: Gradients of Osmotic Pressure of Cell Sap in the Area of One Leaf Blade	39
SLAVÍK, B.: The Relation of the Refractive Index of Plant Cell Sap to its Osmotic Pressure	48
SMETÁNKOVÁ, M.: Dry Matter Production and Growth in Length of Overground Parts of <i>Carex humilis</i> LEYSS	235
SPURNÝ, M.: The Evaluation of Experimental Results by Using Graphs with Conjugate Scales	266
SVOBODOVÁ, J.: A New Strain of Tobacco Mosaic Virus Caused by Influencing the Meta- bolism of the Host	113
SVOBODOVÁ, J.: The Behaviour of the S-strain of Tobacco Mosaic Virus as Determined by Biological Tests	126
ŠESTÁK, Z.: A Method of Storage of Leaf Samples for Chlorophyll Analysis	287
ŠESTÁK, Z. see PRÁT, S.	
TICHÝ, V.: Über den Einfluss einiger Humusstoffgruppen auf den Gehalt der oberirdischen Weizenteile an reduzierenden und nicht reduzierenden Zuckern	107
TICHÝ, V.: Über den Einfluss äthanollöslicher organischer Kompoststoffe auf den Zucker- metabolismus in grünen Pflanzenteilen	157
TICHÝ, V. see SLADKÝ, Z.	
TOMKOVÁ, J.: Problems of Autosterility in <i>Nicotiana glauca</i> LINK et OTTO. (The Formation of the Inhibitory Factor in the Pistil.) (Brief Comm.)	328
TRNKA, A. siehe RAUŠER, V.	
TUPÝ, J.: Callose Formation in Pollen Tubes and Incompatibility	192
ULLMANN, J. see KREKULE, J.	
ULRYCHOVÁ-ZELINKOVÁ, M.: Cadmium Ions as Inhibitors of Tobacco Mosaic Virus	135
VACKE, J. see PRŮŠA, V.	
VALENTA, V. see ZÁVADA, J.	
ZÁVADA, J., VALENTA, V.: Root Formation in Plants Infected with Yellows-type Viruses.	123

geology, pedology, soil microbiology, floristics and geobotany (PRANTL 1942, MAŘAN 1942, KÁŠ 1942, DOSTÁL 1942, KLIKA 1942), and its microclimate had been partially studied by KLIKA 1928. In view of the fact that work was carried out in a reservation, human interference was at least partially excluded.

The southwestern slope of the Velká hora (gradient 36—44°) is designated as so-called "steppe". Here *C. h.* forms a part of the grass community *Festuca vallesiaca-Erysimum crepidifolium* sub as. with *Stipa capillata*. Microclimatic measurements were carried out at a point about half way up the slope, at 335 m. above sea level. There is a layer of fine skeleton soil about 130 mm. thick (average of 25 measurements).

The rocky angle of the southwestern slope, facing westsouthwest, is termed "rocky steppe". The gradient is less (18—20°), and there is a fairly thin layer (74 mm.) of skeleton soil with a high humus content. KLIKA (1942) refers the *C. h.* growing here to the subassociation *Carex humilis-Festuca sulcata* (association *Festuca duriuscula-Seseli osseum*). Measurements were carried out at about the same level (334 m.) as for the "steppe" and at a distance of about 60 m. from it.

The third biotope, referred to as "forest", differs from the preceding primarily because *C. h.* grows here in the shade of fairly dense growths of cornel and oaks [*Cornus mas* L., *Quercus petraea* (Mattusch.) LIEBL., *Quercus pubescens* WILLD.], which cover the northwestern slope of the Velká hora (gradient 24—31°). From the phytocenological point of view these growths form a transition from *Querceto-Carpinetum bohemicum* to the association *Quercus pubescens-Lathyrus versicolcr.* The soil is less skeleton in type and deeper (average 140 mm.). The microclimatic station was at 360 m. above sea level, about 100 m. from the "rocky-steppe" biotope.

In the course of the year the following observations were made: rainfall, soil moisture at a depth of 7—10 cm. measured by weight with drying at 105° C (values related to maximal capillary capacity according to Novák, in air-dried samples—fine scil 2 mm.), exponential average temperature eT (by the sucrose inversion method according to PALLMANN, EICHENBERGER and HASLER 1940) of the soil at a depth of 7—10 cm., minimal temperature (see further) and illumination (luxmeter Metra). Measurements of soil temperature at a depth of 7—10 cm. and of air temperatures (station thermometers under double cover), evaporation (Piche's evaporimeters with green disks, $r = 2$ cm.) and changes in relative air humidity (Assmann's psychrometer) were made on two days, May 2 and September 4, 1957. These measurements were made at a standard height of 20 cm., which corresponded approximately to the height of the overground parts of *C. h.* In most cases the methods employed were taken from Praktikum fytocenologie, ekologie, klimatologie a půdoznalství (KLIKA, NOVÁK and GREGOR 1954).

The tufted growth of the plant allows the conception of an individual to be fixed only by a certain convention. In addition, in a perennial plant such as *C. h.* not only biotope conditions affect growth, but also the age of individuals (RABOTNOV 1950), and it was not possible to determine this for each plant separately. Besides the above difficulties there is the considerable variability of the plant. An individual was considered to be a single sheaf of leaves growing from a separate part (branch) of the rootstock. The influence of varying age of individuals and of variability could be partially excluded by increasing the number of individuals measured.

Dry weight was determined individually for 30 plants from each biotope. Length of the overground parts was measured on the same plants. This can be successfully compared with measurements taken in the field, because drying caused an insignificant decrease in length (0.5—1.6%). The number of shoots from one rootstock from the previous year was also counted. The ground cover of tufts of *C. h.* was determined for the different biotopes by means of horizontal projection (using a wooden frame of 1 m.², divided by a network into dm.²). The growth in length of the overground parts was also determined on three permanent patches by measuring the maximum height, which corresponds in this plant with the length of the leaves. Thirty individuals were measured on each patch.

At the beginning of the growing period measurements were made at weekly intervals, later fortnightly and in the summer monthly, in accordance with the vegetative cycle of *C. h.*

Cultivation experiments

Cultivation experiments were carried out with plants transplanted from natural habitats and with plants raised from seed.

a) In two natural biotopes on Velká hora "mutual transplantation" was carried out; six tufts of *C. h.* were planted individually with undamaged rhizospheres and the original soil in dishes of porous fired clay, which were sunk into the ground. In this way one set of six tufts

was transferred from rocky steppe to forest and the other from forest to rocky steppe. In each biotope control plants from the same biotope were planted in the same way. On the day they were transplanted (May 2, 1956), and again ten days later, the plants were watered with 500 ml. of water; half the transplanted tufts in each biotope were then watered at regular intervals (10—14 days), the others were left unwatered. In 1957 all the plants were left unwatered. Plants from the rocky steppe on Velká hora were selected for the bedding experiments. They were transferred to the soil from Karlštejn, which was freed of skeleton and transported to a bed in the Botanical Garden of Charles University. The plants were transplanted in September 1956 to distances 20×20 cm. The beds were covered by garden-frame windows placed 20 to 30 cm. above the ground. This made it possible to regulate soil moisture in the beds to a certain extent. In addition, in March 1957 some of the beds were shaded by two layers of white organdie stretched beneath the frame windows. Each variant contained 10 tufts with an average of 20 plants. They were surrounded by a protective belt. Four variants were compared in the experiment, each repeated four times: 1. Unshaded plants (only under glass), unwatered; 2. shaded plants, unwatered; 3. unshaded plants, watered; 4. shaded plants, watered. The light intensity (April 29, 1957, 14 00) was reduced by shading to 22.6% of daylight, or 32% of light under glass. Soil moisture on the watered plots was controlled by means of Bouyoucos's resistance method (v. KLIKA, NOVÁK and GREGOR 1954) and it was maintained at a level corresponding approximately to field capacity of undisturbed soils. The watered and unwatered plots were differentiated by varying intervals of watering (watered — 3 to 6 days interval, according to the resistance measured, unwatered — 30 day interval). Soil temperature was compared by the value eT ; three ampules were placed on each plot at a depth of 7—10 cm. (table 1).

Table 1. Bedding experiment — exponential average temperature eT

Period	Unwatered		Watered	
	unshaded	shaded	unshaded	shaded
13.4—27.6	100%	93.1%	96.3%	89.6%
27.6—7.10	100%	95.0%	93.0%	88.6%

b) Seed of *C. h.* from Velká hora (rocky steppe, collected May 16, 1957) was experimentally sown in various types of soil. It was sown on June 4, 1957 in groups of 70 in unglazed earthenware pots which had been filled with 2 mm. soil from two edaphically distinct biotopes of *C. h.*: Velká hora rocky steppe, and Velká hora forest. Skeleton from the soils was used for drainage. The pots were placed in a ventilated hothouse and sprinkled daily. The seeds germinated from the end of June to the end of July. The final germinating power was 30 to 40%. The experiment was ended on October 22, 1957 and the root system and overground parts were washed in running water, diluted HCl and distilled water and dried. Thirty to forty plants from each variant were evaluated. Some of the plants grown in soil from the rocky steppe of Velká hora from seeds originating in this biotope were used for the pot experiments. Plants of equal size were planted in groups of ten in unglazed earthenware dishes which were filled with drainage material and soil used in the bedding experiments; they were placed in a ventilated hothouse. Each variant consisted of three dishes with ten plants in each. Comparison was made between the unshaded variant (only under the frame window, 82% daylight) and the shaded variant (light grey paper was used; light intensity 3.1% daylight, i. e. 3.8% of the intensity under glass). Soil humidity was maintained at about the same level in both cases, using the measured resistance of plaster of Paris blocks inserted in the vessels.

Evaluation of results.

The number of samples (n) which suffices for the measurement of the length of overground parts is 200; it was not, however, possible to achieve this, except in the case of the bedding experiments. The reasons were on the one hand technical, on the other hand it would have involved considerable disturbance of the remaining growths of *C. h.*, which were being renewed slowly. The results and significance of differences are nevertheless evaluated statistically (for methods and symbols v. HRUBÝ and KONVIČKA 1954).

Results

A. Results of measurements in natural biotopes

Environmental conditions

Both the unshaded biotopes, "steppe" and "rocky steppe", are fairly similar as regards their annual rainfall distribution and soil moisture (fig. 1); the main difference is that in the steppe the fluctuations in water content are less than in the rocky steppe (difference between maximum and minimum value for steppe is 41% and for rocky steppe 62%). There was no difference in evaporation and air humidity (fig. 2) during short-term measurements. The daily course of air and soil temperatures in the steppe and rocky steppe (fig. 2) depends to a considerable extent on the season and the macroclimatic conditions of the given day, which is a result of the differing incline and exposure to wind between the two biotopes; measurements made in May showed higher maximum air and soil temperatures for the whole day in the rocky steppe than in the steppe, while the reverse was true for measurements made in September. A better picture of the temperature conditions of these two biotopes is given by the value eT , which was higher for the rocky steppe at both periods (tab. 2), and the values for minimum night temperatures (tab. 3) which were usually lowest for the rocky steppe. These results and the data for soil humidity indicate that the rocky steppe has a more extreme microclimate than the steppe.

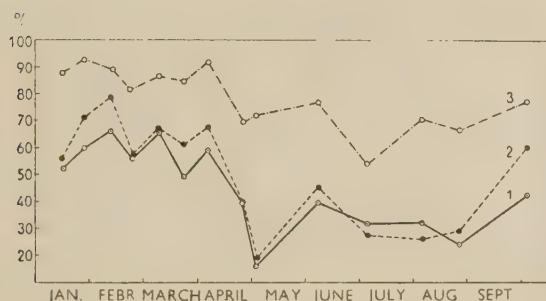


Fig. 1. Changes in soil water content in per cent of maximum capillary capacity on three biotopes of *Carex humilis*. 1 — steppe; 2 — rocky steppe; 3 — forest.

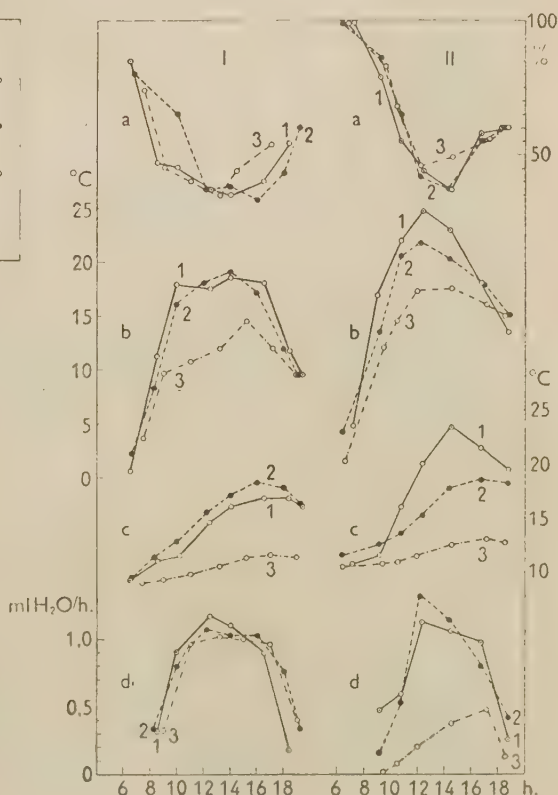


Fig. 2. One-day microclimatic measurements on three *Carex humilis* biotopes. I — May 2, 1957; II — September 4, 1957. a — relative air humidity; b — air temperature; c — soil temperature; d — evaporation. 1 — steppe; 2 — rocky steppe; 3 — forest.

The forest biotope of *C. h.* differs from both "steppe" type biotopes not only in reduced light intensity (March 9 : 66%, May 17 : 15.2%, August 4 : 5.8%, November 1 : 55%), but also in its soil humidity which is higher throughout the year and varies only slightly (fig. 1, difference between maximum and minimum only 24%), although the rainfall measured here was always less than in the unshaded biotopes (maximum 96.7%, minimum 30.6% of the value for the rocky steppe). Other differences are a lesser degree of evaporation and a rather higher relative air humidity in the summer (fig. 2), lower air and soil temperatures throughout the day (fig. 2) and lower eT (table 2). The minimum air temperature at night was, however, always the highest in the forest (table 3).

Table 2. Exponential average temperature eT

Period	Steppe	Rocky steppe	Forest
29.3—26.6	93%	100%	82%
26.6—4.10	95%	100%	79%

Table 3. Minimum night air temperatures (20 cm. above ground, °C)

Biotope	2. 5.	3. 5.	27. 6.	3. 8.	24. 8.	4. 10.
Steppe	—0.6	1.4	5.9	13.5	8.0	2.6
Rocky steppe	—1.3	—0.5	3.8	—	6.0	1.4
Forest	0.2	2.9	6.5	14.0	—	0.4

In addition to the microclimatic differences there is a definite edaphic difference between the biotopes, not only as regards depth of the soil, but also its chemical and physical properties, although they are only different kinds of rendzins (MAŘAN 1942).

Final dry matter production of *C. h.*

The average dry weight of single plants showed considerable differences in the biotopes described: at the end of the growing period the value was 50%, lower on the rocky steppe than on the steppe or in the forest. In order to measure the dry weight of whole tufts it is necessary to take into consideration the number of individuals growing from one last-year's rootstock; the ground cover of these tufts is some measure of the amount of *C. h.* in the plant cover (fig. 3).

Time scale of dry matter production and growth in length

In the case of *C. h.* the growth curve of changes in dry weight in relation to time runs parallel to the curve for growth in length for a considerable part of the growing period (correlation coefficient for the period March to June: steppe — 0.98, rocky steppe — 0.97, forest — 0.99; all coefficients were highly significant). Later, however, growth in length slows down and then ceases, while increase in dry weight continues for some time, so that the relation between length and weight of the overground parts ceases to be linear. But at least for the above period of growth it is possible to judge the growth curve on the basis of measurements of length, which could be made frequently enough without harming the natural growths.

The growth curve for all three biotopes consists of exponential segments, which appear in the logarithmic expression (fig. 4). The curve of relative increases (fig. 4) does not therefore fall regularly, but shows three maxima for plants from the steppe and rocky steppe and four for those from the forest. For the sake of comparison average air temperatures are given for periods corresponding to those for which average growth increase was calculated. The data are from the nearest meteorological station at Karlštejn-vinice (fig. 4).

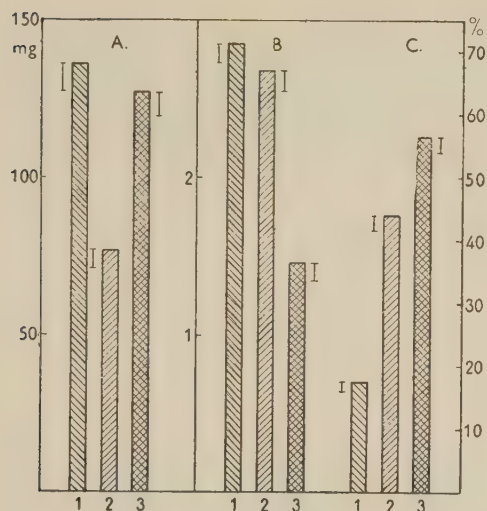


Fig. 3. A — Dry weight of single *C. h.* plants at the close of the growing period (September 6, 1957) on three natural biotopes. B — Average number of shoots on one last year's rootstock of the same plants. C — Percentage ground coverage of *C. h.* tufts on three biotopes. 1 — steppe; 2 — rocky steppe; 3 — forest. Abscissa at top of column marks the decisive deviation from the average ($\bar{s}\bar{x}$).

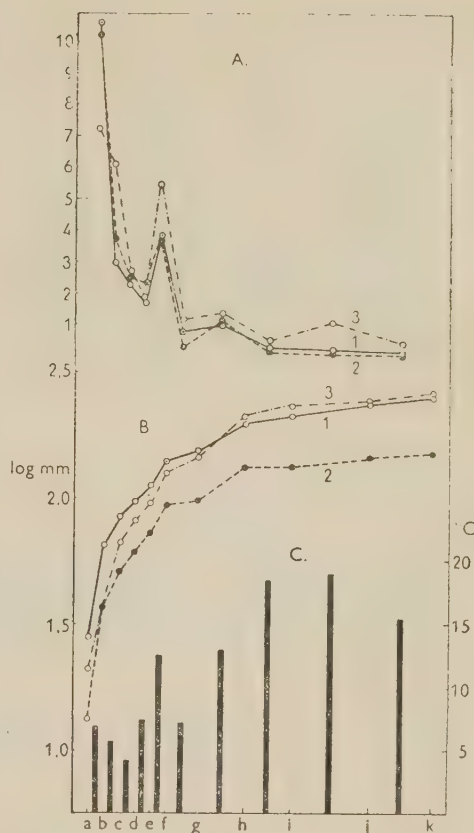


Fig. 4. A — Dependence of relative increases (increased in length in mm.: length of overground parts in mm.) on time. B — Dependence of logarithm of length of overground parts on time. C — Changes in average air temperatures (meteorological station Karlštejn-vinice). Dates of measuring: a — March 29; b — April 5; c — April 12; d — April 19; e — April 26; f — May 2; g — May 14; h — June 6; i — June 26; j — August 4; k — September 6; 1957. 1 — steppe; 2 — rocky steppe; 3 — forest.

B. Results of the cultivation experiments

Transplantation to natural biotopes

The aim of the experiment was to separate as far as possible the influence of soil properties on the growth of *C. h.* from the other factors, predominantly the microclimatic.

Plants taken from the rocky steppe and those from the forest attained greater length of the overground parts by the end of the growing period when they were cultivated in the forest than when they were grown on the rocky steppe; the plants on the rocky steppe which were watered were also higher than the unwatered. Differences caused by the origin of the plants (*C. h.* from the forest was higher on both biotopes during the first year) disappeared during the second year after transplantation (fig. 5).

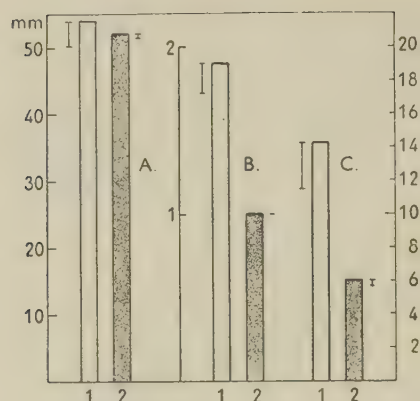


Fig. 5. Transplantation on natural biotopes. A. — rocky steppe; B. — forest. 1 — tufts from rocky steppe, unwatered; 2 — tufts from rocky steppe, watered; 3 — plants from forest, unwatered; 4 — plants from forest, watered. Abscissa marks decisive deviation from average ($s\bar{x}$).

Bedding experiment

The aim of the experiment was to separate at least partially the influence on growth of light intensity from that of the water factor.

It is evident from table 4 that the water factor had the greatest influence on the length of the overground parts. In the case of watered plants the shaded and unshaded variants showed no significant differences. The differences in growth obtained in the September measurements of these two variants with their water supply insufficient were due to the fact that the soil water content for the shaded variant could not be maintained at such a low level as for the unshaded (the result of lower soil temperatures—v. table 1—causing lower evaporation).

Pot experiment

The pot experiment was planned to eliminate this secondary effect of soil moisture and make it possible to confirm the influence of light intensity; as can be seen in fig. 6, lengthening of the

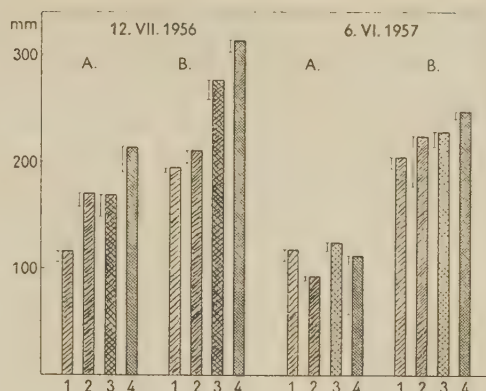
Table 4. Bedding experiment — length of plants in mm.

Date	Unwatered		Watered	
	unshaded	shaded	unshaded	shaded
25. 6.	141.5 ± 3. 12.23	147.4 ± 3. 15.8	289.0 ± 3. 16.3	269.2 ± 3. 9.83
17. 9.	197.7 ± 3. 14.17	250.7 ± 3. 15.5	333.2 ± 3. 20.4	352.7 ± 3. 9.27

Table 5. Sowings in various soils — length and weight of overground parts and root system

Soil	Overground parts		Root system	
	length, mm.	weight, mg.	length, mm.	weight, mg.
Rocky steppe	67.3 ± 3. 2.91	25.54 ± 3. 3.42	131.2 ± 3. 8.13	14.2 ± 3. 1.84
Forest	69.0 ± 3. 3.48	23.64 ± 3. 3.66	115.7 ± 3. 9.54	10.3 ± 3. 1.49

Fig. 6. Pot experiment. A. — length of leaves in mm. B. — Number of shoots on one rootstock. C. — number of leaves on one plant. 1 — without shade; 2 — shaded. Abscissa marks decisive deviation from average ($s\bar{x}$).



overground parts was not caused even by great reduction of light intensity, while the average number of leaves on single plants and the number of shoots from one rootstock were greater for the unshaded variant than for the shaded.

Sowing in different soils

Specimens grown in soils from two different biotopes on Velká hora (forest—rocky steppe) did not show any significant differences in length and weight of the overground parts or root system (table 5).

Discussion

Under the given conditions the least favourable biotope for dry weight production of single plants of *Carex humilis* was that of a definitely “xerothermic” character (here referred to as rocky steppe); but the plants develop a quantity of tillers and form a high percentage of the plant cover. The forest biotope shows a high weight production for single plants, but tillering is very limited (probably due to the lower light intensity—v. result of the pot experiment, and MITCHELL’s 1953 results for *Lolium* sp. div.). Nevertheless, a high degree of coverage by the tufts was found here, even higher than on the rocky steppe. The lowest percentage of coverage was obtained on the steppe, i.e. in a biotope where both dry weight production and formation of tillers are considerable.

This contradiction between dry matter production of tufts of *C. h.* and the percentage of coverage on the different biotopes leads to the assumption that the distribution of *C. h.* under the given conditions is not determined by biotope factors alone.

Some further observations contribute to the evaluation of the favourability of the different biotopes.

The percentage of flowering tufts (determined for 100 tufts selected at random at the maximum flowering period): steppe 70% (6—10 flowers on one tuft), rocky steppe 45% (10—20 flowers on one tuft), forest 2% (2 to 3 flowers on one tuft).

Length of ears (average from 25 measurements, March 9, 1957): steppe 39.0 ± 3.1 mm.; rocky steppe 26.4 ± 3.1 mm.; forest 22.4 ± 3.1 mm. These data and the results of length measurements on the steppe and rocky steppe correspond to MAHN'S (1957) observations of the growth of *C. h.* on soils of varying depth.

Length of withered parts of leaves at the end of the growing period (September 6, 1957): rocky steppe 32.1% of total length of leaves; steppe 23.6%; forest 8.6%. On the steppe and rocky steppe the leaf ends began to wither at the beginning of June, in the forest at the beginning of September.

This finding also indicates that the steppe is a fairly favourable biotope for *C. h.*, which is in contrast to data on the small extent of its ground coverage on this biotope. This once more indicates that other factors of the biotope than climatic and edaphic ones influence the distribution of this plant.

An explanation may be sought in the work of some authors dealing with this problem. BOYSEN-JENSEN (1949) considers the competitive ability of the plant to be a factor determining whether the so-called potential area of a plant species (determined by its requirements on the biotope) becomes its actual area. ELLENBERG (1953) demonstrates experimentally that in some species the so-called ecological optimum (the conditions under which the relative dry matter production of the species concerned is highest in mixed culture) differs from the physiological optimum (the conditions under which the dry matter production of a species is highest in pure culture).

It is therefore possible to advance the assumption that *C. h.* is limited in its distribution on the steppe by the competition of herbaceous tufted xerothermic species, which do not tolerate the more extreme conditions of the rocky steppe or the low light intensity in the forest. It will, however, be necessary to check the data on relative production of these species on the biotopes here dealt with. In this connection it may be noted that *C. h.* being a myrmecochore plant is spread with difficulty (KRAUSE 1940), which is one of the factors leading to a marked decrease in the competitive power of this plant.

While comparison of the final dry matter production only enabled the relative favourability of the different biotopes for *C. h.* to be established, the results of observations of dry matter production during the growing period allow a more detailed picture to be drawn of the relation between the plant and its biotope.

SAMPSON and McCARTY (1930) obtained a growth curve composed of similar exponential segments as for *C. h.* under natural conditions for *Stipa pulchra*; HAMMOND and KIRKHAM (1949) connect similar segments of the growth curve of soya and maize (on the basis of dry weight) with ontogenetic changes—inflorescence and seed formation. For *C. h.* no connection could be found between ontogenesis and changes in growth intensity, which are more likely to be the result of the influence of external factors. Comparison of the curve of increases in length with changes in average air temperatures shows that at the beginning of the growing period, when soil humidity was adequate, the limiting factor was probably temperature.

Average temperature is not, however, decisive for the final production of single plants (on the contrary, on the rocky steppe where eT was highest

production was lowest). It is probable that at a further stage of the growing period, when temperatures are higher, soil moisture acts as the limiting factor (besides the simultaneous influence of internal factors). This assumption could not be confirmed from growth curves, because rainfall in 1957 was somewhat abnormal. Confirmation is, however, provided by the results of the cultivation experiments.

The very considerable influence of the water factor on growth is evident from the results of experiments in transplanting tufts to natural biotopes, and from the bedding experiments. These experiments showed that improved water supply causes greater growth in length and thus greater dry matter production (v. correlation coefficient); on the other hand reduction in light intensity was not reflected in growth in length. Results of the transplant experiments further show that the chemical composition of the soil has an insignificant effect on growth, if we assume that the soil transferred in pots maintained its original edaphic properties during the course of the experiment; confirmation was provided by the experiment in which seed of the same origin was sowed in different soils.

This study forms part of diploma work carried out in 1956 to 1958 (SMETÁNKOVÁ 1958).

Acknowledgment:

† Prof. Dr. Jaromír Klika suggested the theme of work; thanks are due to his assistant Ing. Jan Jeník, who directed the work after him, for valuable advice and helpful interest. Microclimatic measurements were made in collaboration with Karin Strnadová; some jointly obtained results are also published in the work by STRNADOVÁ (1958). Dr. R. Mikýška, head of the Geobotanical Laboratory of the Czechoslovak Academy of Sciences, Průhonice, provided facilities for the preparation of ampoules for measuring eT.

References

- BOYSEN-JENSEN, P.: Causal plant geography. — Det Kgl. Danske Videnskabernes Selskab, Biologiske Meddelelser (Köbenhavn) **21** : 1—18, 1949.
- BRAUN-BLANQUET, J., MOOR, M.: Prodromus der Pflanzengesellschaften — 5. Verband des Bromion erecti. Montpellier 1938.
- DOSTÁL, J.: Seznam kapradorostů a jevnosnubných rostoucích v rezervaci Velká hora [List of Pteridophytes and Spermatophytes growing in the Velká hora reservation]. — Sborník ČAT **16** : 517—520, 560—580, 1942.
- DRUDE, A.: Über die Standortsverhältnisse von *Carex humilis* LEYSS. bei Dresden als Beitrag zur Frage der Bodenstätigkeit. — Ber. Dtsch. bot. Ges. **5** : 286—293, 1887.
- ELLENBERG, H.: Physiologisches und ökologisches Verhalten derselben Pflanzenarten. — Ber. Dtsch. bot. Ges. **65** : 350—361, 1953.
- HAMMOND, L. C., KIRKHAM, D.: Growth curves of soyabeans and corn. — Agron. J. **41** : 23—29, 1949.
- HRUBÝ, K., KONVIČKA, O.: Polní pokusy, jejich zakládání a hodnocení [Field experiments, their establishment and evaluation]. — Olomouc 1954.
- KÁŠ, V.: Mikrobiologická charakteristika půd [The microbiological description of soils]. — Sborník ČAT **16** : 659—668, 1942.
- KLIKA, J.: Geobotanická studie rostlinných společenstev Velké hory u Karlštejna [A geobotanical study of plant communities of Velká hora near Karlštejn]. — Rozpravy II. tř. Čes. Akad. (Praha) **33** : 1—42, 1928.

- KLIKA, J.: Die Gesellschaften des Festucion vallesiaceae Verbandes in Mitteleuropa. — *Studia bot. čechica* **2** : 117—157, 1939.
- KLIKA, J.: Rostlinná společenstva Velké hory [Plant communities of Velká hora]. — *Sborník ČAT* **16** : 580—602, 1942.
- KLIKA, J., NOVÁK, V., GREGOR, A.: Praktikum fytocenologie, ekologie, klimatologie a půdoznalství [Practical phytocenology, ecology, climatology and soil science]. — Praha 1954.
- KRAUSE, W.: Untersuchungen über die Ausbreitungsfähigkeit der niedrigen Segge (*Carex humilis* LEYSS.). — *Planta* **31** : 91—168, 1940.
- KRAUSE, W.: Über Keimung und Jugendwachstum im Hinblick auf die Entwicklung der Pflanzendecke. — *Planta* **38** : 132—156, 1950.
- MAHN, E. G.: Über die Vegetations- und Standortverhältnisse einiger Porphyrkuppen bei Halle. — *Wiss. Ztschr. Martin Luther Univ., Halle—Wittenb. Math. Nat.* **6** : 177—208, 1957.
- MAŘAN, B.: Pedologický výzkum půd na Velké hoře [Pedological investigation of soil on Velká hora]. — *Sborník ČAT* **16** : 602—610, 644—658, 1942.
- MITCHELL, K. J.: Influence of light and temperature on the growth of ryegrass (*Lolium* sp.). I. Pattern of vegetative development. — *Physiol. Plant.* **6** : 21—46, 1953.
- PALLMANN, H., EICHENBERGER, E., HASLER, A.: Eine neue Methode der Temperaturmessung bei ökologischen oder bodenkundlichen Untersuchungen. — *Ber. Schweiz. bot. Ges.* **50** : 337—362, 1940.
- PODPĚRA, J.: Květena Moravy III [Flora of Moravia III]. — Brno 1928.
- PRANTL, F.: Geologická stavba rezervace Velké a Dřínové hory [The geological structure of Velká and Dřínová hora]. — *Sborník ČAT* **16** : 500—505, 1942.
- RABOTNOV, T. A.: Zhiznennyi cikl mnoholetnikh travyanistykh rasteny v lugovykh cenozech [The life cycle of perennial herbs in meadow communities]. — *Geobotanika* **6** : 7—204, 1950.
- SAMPSON, A. W., McCARTY, E. C.: The carbohydrate metabolism of *Stipa pulchra*. — *Hilgardia* **5** : 61—100, 1930.
- SMETÁNKOVÁ, M.: Ekologická studie o ostřici nízké (*Carex humilis* LEYSS.). — [Ecological study of *Carex humilis* LEYSS.] Diss., Charles University, Praha, 1958.
- SMIRNOV, P. A.: Issledovaniya flory Tambovskoy gubernii v 1917—21 g. [Investigation of the flora of Tambov Gubernia in 1917—21]. — *Zh. bot. obshch.* **8**, 1923 (cit. Podpěra 1928).
- STRNADOVÁ, K.: Příspěvek k ekologii dřevin v xerothermní oblasti středních Čech [The ecology of woody plants in the central Bohemian area]. — Diss., Charles University, Praha, 1958.

Address: Milena Smetánková, Prom. Biol., Výzkumný ústav rostlinné výroby ČSAZV, Praha-Ruzyně.

BIOL. PLANT. **1** (4) : 235—247, 1959

Накопление сухого вещества и рост в длину надземных частей осоки *Carex humilis* LEYSS

МИЛЕНА СМЕТАНКОВА

Отделение геоботаники Кафедры ботаники Биологического факультета
Карлова университета, Прага

Поступило 23. февраля 1959 г.

Резюме

В трех по микроклимату явственно отличающихся и при помощи точных измерений охарактеризованных биотопах (степь, каменистая степь и лес) в области Чешского карста («Велка Гора» близ Карлштейна, Беровского р-на, Средняя Чехия) производилось сравнительное исследование прироста сухого вещества и роста в длину

надземных частей осоки *Carex humilis* LEXSS. Самый высокий прирост сухого вещества надземных частей отдельных растений имел место в степи, где осока сильно кустилась и обильно цвела. Процент покрытия был, однако, в степи ниже, чем в двух остальных биотопах. В лесу и в каменистой степи, где развитие осоки было ограничено (в первом случае из-за слабого кущения и цветения, в каменистой степи из-за низкой продукции отдельных растений), процент покрытия был выше, чем в степи. Распространение исследованного растения зависит, повидимому, не только от одних лишь климатических и почвенных условий местонахождения, но и от какого-то другого фактора, вероятно от конкуренции.

Из сравнения кривой прироста (построенной на основании данных по изменению длины надземных частей, так как последняя — в случае *C. humilis* длина листьев — в начале вегетационного периода прямо пропорциональна весу сухого вещества) с кривой средней температуры воздуха вытекает, что в начальный период роста ограничивающим фактором роста является температура.

В вегетационных опытах с пересаженными и посеянными растениями отчасти удалось выделить влияние отдельных факторов на рост *C. humilis*. На основании этих данных можно заключить, что на рост в длину надземных частей и тем самым также на прирост сухого вещества влияет, прежде всего, водный режим. Не удалось доказать влияние интенсивности освещения и химического состава почвы на рост в данных условиях.

Различия в росте, наблюдаемые в природных условиях, зависят, значит, главным образом от водного режима данного биотопа. Это верно также в случае более сильного роста осоки *C. humilis* в лесу. Более слабый рост осоки в условиях каменистой степи по сравнению со степью, не удалось объяснить экспериментальным путем, так как условия этих двух биотопов не удастся воспроизвести в искусственных условиях. На основании результатов измерений в естественных условиях можно заключить, что в условиях каменистой степи рост осоки *C. humilis* сильно отстает, повидимому, в связи с более экстремным микроклиматом данного биотопа.

Der Einfluss der Dichte des Pflanzenbestandes auf Wachstum, Wasser-, Chlorophyll- und Phosphorgehalt in Weizen und Korn

FRANTIŠEK PLHÁK

Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie und Genetik an der naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität in Brno

Eingegangen am 4. März 1959

Souhrn

Pokus s pšenicí Podbořankou a žitem Těšnovským probíhal v polních podmínkách s použitím pěti různých hustot výsevu. Nejnižší hustota odpovídala běžné normě výsevu obilovin (400 obilok na 1 m²), poslední byla pětikrát vyšší. Během vegetace bylo provedeno pět měření.

Ukázalo se, že zvýšená hustota porostu působila brzdivě nejvíce na růst rostlin. Vegetativní orgány pokusných rostlin byly při tom v růstu více oslabovány než reprodukční. Zvýšená hustota způsobila též snížení obsahu chlorofylu, fosforu a vody v pokusných rostlinách nejnápadněji na konci vegetace. Rostliny z nejhustších porostů vyčerpaly z půdy méně fosforu než rostliny z normálních porostů. Je možno předpokládat, že to bylo způsobeno značně sníženou sorpční schopností kořenového systému.

Zusammenfassung

Für die vorliegende Arbeit wurden die Weizensorte Podbořanka und Těšover Korn benutzt. Der Versuch verlief unter Feldbedingungen bei verschiedenen Pflanzenbestandsdichten. Die schwächste Dichte entsprach der üblichen Norm der Getreideaussaat (400 Getreidekörner auf einen Quadratmeter), die stärkste war fünfmal so dicht. Im Laufe der Vegetationsperiode wurden fünf Messungen durchgeführt.

Es zeigte sich, dass die Dichte des Pflanzenbestandes vor allem das Pflanzenwachstum hemmte. Dabei wurden die vegetativen Organe der Versuchspflanzen stärker als die Reproduktionsorgane geschwächt. Eine Erhöhung der Dichte bewirkte zugleich auch eine Herabsetzung des Gehaltes an Chloro-

phyll, Phosphor und Wasser in den Versuchspflanzen und zwar besonders auffällig gegen Ende der Vegetationsperiode. Die Pflanzen der dichtesten Bestände schöpften weniger Phosphor aus dem Boden, als Pflanzen normaler Bestände. Man kann voraussetzen, dass dies durch eine stark herabgesetzte Sorptionsfähigkeit des Wurzelsystems bewirkt worden ist.

Einleitung und Problematik

Ein Studium der Veränderungen der biologischen Eigenschaften der Pflanzen in verschieden dichten Beständen ist für die landwirtschaftliche Praxis wie auch für die Lösung des allgemeiner Problems der gegenseitigen Beziehungen der Pflanzen äusserst wichtig. Mit einem solchen Studium dieser Veränderungen vornehmlich im Zusammenhang mit den Fragen der Beziehungen der Pflanzen im Rahmen einer Art hat sich eine ganze Reihe von Autoren, beispielsweise SUKAČEV (1953), SABININ (1947), IVANOVSKAJA (1948, 1950), NIKITENKO (1951), SASELJEV (1951), KARANDINA (1953), ZAVADSKIJ (1954), ORLENKO (1955), ŠMÍDOVÁ (1955) und andere beschäftigt. Die angegebenen Autoren arbeiteten mit einer Reihe von Kulturpflanzen unter verschiedenen Bedingungen. Der Grossteil der Autoren gelangt zu Schlüssen, die besagen, dass die Dichte des Pflanzenbestandes das gesamte Pflanzenwachstum ganz wesentlich, aber ebenso auch die Entwicklung der Pflanzen beeinflusst und dass es in allzu dicht gedrängten Pflanzenbeständen zum Absterben der schwächeren Individuen kommt. Die Zahl der eingegangenen Pflanzenindividuen ist umso grösser, je besser die Bodenbedingungen sind, unter denen die Pflanzen wachsen. Hochentwickelte Kulturpflanzen (Weizen) verhalten sich anders, als Pflanzen, die man erst kürzlich zu kultivieren begonnen hat. (Kok-saghyz.) Dies ist durch ein verschiedenes Gleichgewicht bedingt (IVANOVSKAJA 1950).

Als Ursachen dieser Veränderungen an Pflanzen in dichter gedrängten Beständen führen die Autoren Nährstoffe-, Feuchtigkeits- und Lichtmangel an, bewirkt durch das Wachstum einer grösseren Zahl von Individuen auf beschränkter Fläche. Die Ansichten der Autoren unterscheiden sich jedoch stark bei der Wertung dieser Erscheinungen in bezug auf den Charakter der gegenseitigen Beziehungen der Pflanzen — siehe SUKAČEV (1953), SABININ (1947), LYSENKO (1951), IVANOVSKAJA (1948, 1950) und andere.

Im grössten Teile der vorliegenden Arbeiten beurteilen die Autoren den Einfluss der Dichte des Bestandes auf die Pflanzen und auf ihre gegenseitigen Beziehungen nach den Indikatoren des Längenwachstums, des Frischgewichts, des Ernteergebnisses, der morphologischen Veränderungen und nach der Zahl der eingegangenen Pflanzenindividuen. Sehr wenig kümmern sich aber diese Autoren um die physiologischen Veränderungen, die in den Pflanzen vorgegangen sind. Unserer Ansicht nach würde ein Studium der physiologischen Vorgänge und Veränderungen zur Erkenntnis der gegenseitigen Beziehungen der Pflanzen stark beitragen. Darum haben wir uns ein Arbeitsziel gesteckt, das in einer Verfolgung des Wachstums, des Wassergehaltes und des Metabolismus einiger physiologisch wichtiger Stoffe bei Weizen und Korn bei

verschiedener Pflanzenbestandsdichte im Laufe der Vegetationsperiode besteht. Unter den organischen Stoffen des Pflanzenorganismus (des Pflanzenleibes) haben wir den wichtigsten Bestandteil des Assimilationsapparats — das Chlorophyll — gewählt. Von anorganischen Stoffen haben wir den Phosphor im Hinblick auf seine ausserordentliche Wichtigkeit für die metabolischen Vorgänge der Pflanzen bestimmt.

Material und Methode

Für die Versuche haben wir die Těšover Frühlingskornsorte und den Frühlingsweizen Podbořanka verwendet. Die Getreidekörner wurden in gläsernen Schälchen auf Filterpapier vorkeimen gelassen. Ausgesät wurden jedoch nur Getreidekörner, die zu keimen begonnen hatten. Wir wählten fünf verschiedene Aussaatdichten und zwar zu 400, 800, 1200, 1600 und 2000 Körnern auf einem Quadratmeter. Eine Dichte von 400 Körnern auf einem Quadratmeter entspricht der Norm der üblichen Aussaatweise von Getreidekörnern bei einer Reihensaat von 12.5×2 cm und diente als Kontrolle. Die Getreidekörner wurden bei allen Dichten in Reihen ausgesät, die 12.5 cm von einander entfernt waren, sodass sich mit wachsender Dichte der Aussaat nur die Entfernung der Pflanzen in den Reihen von 2 cm bis auf 0.4 cm verringerte. Die Getreidekörner wurden auf kleine Feldstückchen gesät, die jeweils einen Quadratmeter massen und jede Serie wurde dreimal angesetzt. Die Parzellen wurden in der Form des lateinischen Viereckes angeordnet.

Der Versuch verlief im Versuchsgarten des Lehrstuhls für Pflanzenphysiologie und Genetik in Brno vom 18. 4. bis 4. 7. 1957. Der Boden enthielt nach der analytischen Feststellung die übliche Menge von Nährstoffen. Die Vorfrucht war Zuckerrübe.

Im Verlaufe des Versuches wurden fünf Messungen durchgeführt. Frischgewicht und Trockensubstanz wurden bei 50 Pflanzen durchgeführt, die gleichmässig aus allen Ansätzen entnommen worden sind. Weiter wurde der Gehalt an Chlorophyll in frischen Blattspreiten mittels der kolorimetrischen Methode nach GODNÉV (1952) festgestellt. Für die Chlorophyllbestimmungen wurden jeweils Durchschnittsproben eines abgerundeten Gewichts von 2 g aus den oberen intensiv grünen Spreiten entnommen. Bei den Blattspreiten der Versuchspflanzen wurde auch der Phosphorgehalt bestimmt. Die Durchschnittsprobe für die Analyse wurde aus den zerriebenen und bei 105 Grad Celsius getrockneten Spreiten aller Blätter von 50 Versuchspflanzen entnommen. Bei Korn wurde der Phosphorgehalt am Vegetationsende nicht nur in ganzen Blättern, sondern auch im Stroh und in den Getreidekörnern bestimmt. Die Proben wurden durch Verbrennung auf feuchtem Wege mineralisiert und der Phosphorinhalt kolorimetrisch nach BELL und DOISY bestimmt. (Siehe ČATSKÝ, 1955).

Ergebnisse der Versuche

Die Erhöhung der Aussaatdichte wirkte stark auf das Wachstum der Korn- und Weizenpflanzen. Das Frischgewicht wie auch die Trockensubstanz der Pflanzen waren in allen Fällen umso niedriger, je dichter der Pflanzenbestand war (siehe Tabelle 1 und 2). Der hemmende Einfluss der stärkeren Dichte äusserte sich jedoch im Laufe einer Vegetationsperiode nicht gleichartig. Bei den ersten Messungen äusserte sich eine weniger intensive Einwirkung der höheren Dichte auf die Herabsetzung des Wachstums. So verringerte sich der Wuchs der Weizenpflanzen bei fünffacher Aussaatdichte in der Phase der Staudenbildung nur 2.6 mal und bei Beginn der Stengelbildung 3.4 mal. Demgegenüber entsprach bereits gegen Ende der Stengelbildung und in der Phase der Blüte einer fünffachen Dichte ein fünffach schwächeres Wachstum bei Weizen und Korn. In diesen Phasen vorgrösserten sich die Wachstumshemmung am stärksten. In den weiteren Phasen bis zur Ernte äusserten sich die Unterschiede im Wachstum von Korn unter dem Einfluss der Dichte nur unbedeutend und bei Weizen verringerten sie sich sogar im Gegenteil dazu. (Siehe Tabelle 1 und 2.)

Die Bildung und der Gehalt an Chlorophyll in den Pflanzen zeigte sich nicht so eindeutig durch die Erhöhung der Dichte des Bestandes beeinflusst. In der Phase der Staudenbildung zeigte sich der höchste Chlorophyllgehalt in Blattspreiten von Pflanzen der niedrigsten Bestandsdichte, bei den übrigen Pflanzen erschien sein Gehalt herabgesetzt. In der Phase der Stengelbildung war dies umgekehrt; Die Pflanzen des Kontrollfeldes enthielten am wenigsten Chlorophyll. Die Unterschiede erreichten bei Korn und auch bei Weizen 10%. (Siehe Tabelle 3.) In den übrigen Phasen, beginnend mit dem Schossen stimmen die Änderungen des Chlorophyllgehaltes vor allem bei Weizen im Ganzen mit den Wachstumsänderungen überein. In schüttereren Beständen ist der Chlorophyllgehalt höher, in dichteren niedriger. In der Phase der (Milchreife, sind maximale Unterschiede von 32% gemessen worden. Bei Korn jedoch war noch in der Phase des Blühens der Chlorophyllgehalt bei Pflanzen aller Dichten nahezu gleich und erst in den weiteren Phasen kam es zu Änderungen seines Gehaltes genauso wie bei Weizen. Die Unterschiede machten hier gegen Ende der Vegetation 15% aus. (Siehe Tabelle 3.)

Bei den Weizen- und Korn-Versuchspflanzen wurden auch die Unterschiede im Phosphorgehalt bestimmt. Die Pflanzen aus Beständen höherer Dichten wiesen im Verlauf der Vegetation in den Blattspreiten weniger Phosphor auf. (Siehe Tabelle 4.) In den Blattspreiten von Weizen wurden zwischen den extremen Dichten zu Anfang der Vegetation Unterschiede bis zu 13% ermittelt. Im Zeitraum des Blühens waren die Unterschiede des Phosphorgehaltes in den Blattspreiten niedriger (5%), während sie sich in der Periode der Kornbildung bis zu 27% erhöhten. Bei Korn war dies ähnlich. (Siehe Tabelle 4.) Die Erhöhung der Dichte bewirkte hier besonders zu Vegetationsende ein Absinken des Phosphorgehaltes, wobei sich in Stengel und Blättern der Phos-

Tabelle 1. Einfluss der Erhöhung der Dichte des Pflanzenbestandes auf den Wuchs von Weizen innerhalb einer Vegetationsperiode

Zahl d. ausgesäten Getreidekörner auf einen m ²	Durchschnittliches Frischgewicht und Trockensubstanz einer Weizenpflanze in Gramm				
	21. 5. Staudenbildung	31. 5. Beginn d. Sten- gelbildung	12. 6. Ende d. Sten- gelbildung	24. 6. Blüte	4. 7. Milchreife
400 Frischgewicht Trockensubst.	0.68 ± 3. 0.044 0.116 ± 3. 0.008	1.29 ± 3. 0.140 0.230 ± 3. 0.033	3.72 ± 3. 0.372 0.854 ± 3. 0.062	4.41 ± 3. 0.496 1.384 ± 3. 0.160	4.52 ± 3. 0.327 1.765 ± 3. 0.092
800 Frischgewicht Trockensubst.	0.56 ± 3. 0.045 0.097 ± 3. 0.007	0.91 ± 3. 0.095 0.207 ± 3. 0.024	2.01 ± 3. 0.179 0.492 ± 3. 0.043	1.77 ± 3. 0.161 0.585 ± 3. 0.048	2.66 ± 3. 0.327 1.043 ± 3. 0.131
1200 Frischgewicht Trockensubst.	0.38 ± 3. 0.020 0.068 ± 3. 0.002	0.644 ± 3. 0.054 0.148 ± 3. 0.011	1.43 ± 3. 0.109 0.354 ± 3. 0.027	1.37 ± 3. 0.123 0.457 ± 3. 0.041	1.61 ± 3. 0.157 0.647 ± 3. 0.059
1600 Frischgewicht Trockensubst.	0.33 ± 3. 0.015 0.060 ± 3. 0.002	0.49 ± 3. 0.032 0.115 ± 3. 0.006	1.03 ± 3. 0.042 0.256 ± 3. 0.006	1.00 ± 3. 0.105 0.330 ± 3. 0.035	1.23 ± 3. 0.122 0.495 ± 3. 0.051
2000 Frischgewicht Trockensubst.	0.26 ± 3. 0.018 0.051 ± 3. 0.002	0.38 ± 3. 0.061 0.096 ± 3. 0.002	0.83 ± 3. 0.037 0.219 ± 3. 0.009	0.85 ± 3. 0.102 0.275 ± 3. 0.023	0.94 ± 3. 0.076 0.376 ± 3. 0.021

 $\bar{x} \pm 3 \cdot s_{\bar{x}}$

Tabelle 2. Einfluss der Erhöhung der Dichte des Pflanzenbestandes auf den Wuchs von Korn innerhalb einer Vegetationsperiode

Zahl d. ausgesäten Getreidekörner auf einem m ²	Durchschnittliches Frischgewicht und Trockensubstanz einer Kornpflanze in Gramm				
	21. 5. Ende d. Stauden- bildung	31. 5. Stengelbildung	12. 6. Beginn der Blüte	24. 6. Beginn der Milchreife	4. 7. Ende der Milchreife
400	Frischgewicht Trockensubst. 1.65 ± 3. 0.159 0.236 ± 3. 0.025	3.29 ± 3. 0.232 0.660 ± 3. 0.061	4.80 ± 3. 0.335 1.335 ± 3. 0.082	5.18 ± 3. 0.392 1.889 ± 3. 0.130	6.56 ± 3. 0.460 2.41 ± 3. 0.093
800	Frischgewicht Trockensubst. 1.23 ± 3. 0.074 0.181 ± 3. 0.013	2.16 ± 3. 0.145 0.443 ± 3. 0.030	3.08 ± 3. 0.309 0.896 ± 3. 0.030	2.86 ± 3. 0.111 1.032 ± 3. 0.043	3.77 ± 3. 0.141 1.422 ± 3. 0.029
1200	Frischgewicht Trockensubst. 0.82 ± 3. 0.032 0.125 ± 3. 0.005	1.51 ± 3. 0.107 0.235 ± 3. 0.016	1.67 ± 3. 0.084 0.489 ± 3. 0.018	1.83 ± 3. 0.037 0.678 ± 3. 0.036	2.18 ± 3. 0.156 0.835 ± 3. 0.065
1600	Frischgewicht Trockensubst. 0.69 ± 3. 0.055 0.102 ± 3. 0.007	1.19 ± 3. 0.156 0.232 ± 3. 0.034	1.23 ± 3. 0.090 0.355 ± 3. 0.023	1.39 ± 3. 0.083 0.503 ± 3. 0.025	1.58 ± 3. 0.037 0.596 ± 3. 0.033
2000	Frischgewicht Trockensubst. 0.48 ± 3. 0.027 0.074 ± 3. 0.003	0.83 ± 3. 0.071 0.176 ± 3. 0.012	0.97 ± 3. 0.018 0.300 ± 3. 0.008	0.98 ± 3. 0.062 0.364 ± 3. 0.024	1.10 ± 3. 0.084 0.446 ± 3. 0.032

phorgehalt in den Pflanzen der dichtesten Bestände um nahezu 42% herabsetzte. In den Getreidekörnern war diese Herabsetzung schwächer und erzielte ein Maximum von 12%.

Die Dichte des Bestandes beeinflusste selbst den Wassergehalt im Pflanzenkörper, wenn auch in weit schwächerem Masse als bei den übrigen untersuchten Merkmalen. Bei Korn wurde in der Phase der Staudenbildung ein Maximalunterschied von 3% ermittelt, der sich im Verlaufe der Vegetation unbedeutend erhöhte und in der Phase der Milchreife 7% erzielte. (Siehe Tabelle 5.) Ähnliche Veränderungen im Wassergehalt wurden auch bei Weizen allerdings mit dem Unterschiede festgestellt, dass ihr Maximum in der Phase der Stengelbildung mit 7% erreicht wurde.

Diskussion

Aus der Arbeit der Autoren über den Einfluss der Dichte des Pflanzenbestandes auf die Pflanzen geht hervor, dass eine Erhöhung der Dichte unter sonst gleichen Bodenbedingungen das gesamte Wachstum der Pflanzen hemmt; dass Frischgewicht und auch Trockensubstanz der Pflanzen herabgesetzt werden. Lediglich das Längenwachstum wird in einigen Fällen bei Pflanzen dichter Bestände vorübergehend intensiviert, aber nur in den Frühperioden des Wachstums, wie z. B. ZAVADSKIJ (1954) anführt.

Die Verfolgung der Wachstumsvorgänge bei unseren Versuchen erweist eine ähnliche Hemmwirkung auf das Wachstum bei Weizen

Tabelle 5. Einfluss der Dichte des Pflanzenbestandes auf den Wassergehalt in Weizen- und Kornpflanzen im Laufe einer Vegetationsperiode

Anzahl der auf einem m ² ausgesäten Getreidekörner	Wassergehalt in Prozenten des Frischgewichts									
	in Weizenpflanzen					in Kornpflanzen				
	21. 5. Stauden- bildung	31. 5. Beginn d. Stengel- bildung	12. 6. Ende d. Stengel- bildung	24. 6. Blüte	4. 7. Milchreife	21. 5. Ende d. Stauden- bildung	31. 5. Stengel- bildung	12. 6. Beginn d. Blüte	24. 6. Beginn d. Milchreife	4. 7. Ende d. Milchreife
400	83.0	77.6	77.1	68.2	61.0	85.7	79.4	72.6	63.5	63.2
800	82.7	77.2	75.6	66.9	60.7	85.3	79.6	70.9	61.9	62.3
1200	82.2	77.0	75.2	66.6	59.8	84.8	80.4	70.7	62.9	61.3
1600	81.7	76.6	75.1	66.9	59.7	85.1	80.5	71.0	63.9	62.4
2000	80.7	74.9	73.6	67.7	59.8	84.3	78.9	69.0	62.7	59.3

und Korn bei verstärkter Aussaat. Wir sehen aber, dass die Wachstumshemmung nicht in allen Phasen gleich war. Am stärksten wurde sie am Ende der Phasen festgestellt, während welcher die Getreide-Arten unter normalen Bedingungen am intensivsten wachsen, das ist in der Phase der Stengelbildung und des Schossens, gegebenenfalls auch noch zu Beginn der Blüte. In allen übrigen Phasen war die Wachstumshemmung schwächer. Das hatte zur Folge, dass das Wachstum der Pflanzen dichter Bestände langsamer und regelmässiger vonstatten ging. Die Unterschiede der Intensität des Wachstums in den einzelnen Phasen erschienen hier verwischt und die Wachstumsgeschwindigkeit ist wahrscheinlich von der Geschwindigkeit der physiologischen Vorgänge bestimmt worden, die unter erschwerten Bedingungen verlangsamt waren. Das bestätigen auch die festgestellten Veränderungen des Wasser-, Chlorophyll- und Phosphorgehaltes.

Die Änderungen des Chlorophyllgehaltes sind in den Anfangsphasen zwar keineswegs eindeutig und lassen sich auch auf Grund unserer Versuche schwer erklären. Im späteren Verlaufe jedoch besteht eine deutliche Beziehung zwischen der Dichte des Bestandes und dem Chlorophyllgehalte. Das Absinken der Chlorophyllmenge erreicht bei Pflanzen des dichtesten Bestandes 25 bis 30%. Man kann vermuten, dass eine so starke Herabsetzung des Chlorophyllgehaltes die Photosynthese und das Wachstum der Pflanzen beeinflusst hat. Weil diese Herabsetzung erst nach der Hauptphase des Wachstums der Pflanzen eintrat, kann man sie nicht als primäre Ursache der Schwächung der Pflanzen, sondern eher als sekundäre Erscheinung ansehen, hervorgerufen durch ungenügende Ernährung und Lichtzufuhr.

Das Absinken des Chlorophyllgehaltes gegen Ende der Vegetationsperiode bei Pflanzen dichter Bestände kann auch mit seiner früher einsetzenden und rascheren Zersetzung in den Assimilationsgeweben dieser Pflanzen zusammenhängen. Dieser Schluss würde die Angaben von IVANOVSKAJA (1950) unterstützen, die festgestellt hat, dass unter dem Einfluss einer erhöhten Dichte die Vegetationsdauer bei einjährigen Pflanzen verkürzt wird.

Die Herabsetzung des Phosphorgehaltes in den Pflanzen kann als wesentliche Ursache der Schwächung des Pflanzenwuchses angesehen werden, wie aus zahlreichen Literaturnachweisen hervorgeht. So stellten beispielsweise ERGLE und EATON (1957) einen solchen Zusammenhang bei Baumwollpflanzen bei herabgesetzter Phosphordosis im Nährboden fest. HOWEL (1954) gab ähnliche Ergebnisse bei Sojapflanzen an. Unsere Versuche bestätigen gleichfalls einen ähnlichen Zusammenhang, auch wenn hier auch andere Faktoren die Wachstums minderung bewirkten. Die Herabsetzung des Phosphorgehaltes in den Versuchspflanzen lässt sich jedoch in unserem Falle nicht nur durch seine ungenügende Menge im Boden für die Ernährung der erhöhten Anzahl von Pflanzen erklären. Wie aus Tabelle 6 hervorgeht, in der die Gesamtmenge Phosphor erfasst ist, die von allen Pflanzen der Fläche eines Quadratmeters dem Boden entnommen worden ist, haben die Pflanzen der dichtesten Bestände weniger Phosphor aus dem Boden geschöpft, als Pflanzen in normaler Dichte. Die Herabsetzung des Phosphorgehaltes in den Pflanzen ist darum wahrscheinlich durch die geschwächte Sorptionsfähigkeit des Wurzelsystems der Pflanzen und nicht durch einen absoluten Phosphormangel im Boden verursacht. Ob diese Herabsetzung der Sorptionsfunktion nur durch eine ungenügende Entwicklung des Wurzelsystems verursacht worden ist, oder auch durch die Veränderung anderer, vor allem physiologischer Funktionen der Wurzeln, lässt sich aus den bisherigen Versuchen nicht ermitteln.

Die Erhöhung der Dichte des Pflanzenbestandes hat sich also wie auf das gesamte Pflanzenwachstum, so auch auf einzelne physiologische Vorgänge ausgewirkt. Diese Wirkung war jedoch nicht gleichartig und wirkte sich verschieden intensiv auf verschiedene Pflanzenteile aus. So zeigten bei-

Tabelle 6. Einfluss der Dichte des Pflanzenbestandes auf die Gesamtausbeute an Stroh und Körnern, auf den Gesamtgehalt von Phosphor in Stroh, Körnern und im ganzen oberirdischen Teile der Kornpflanzen auf der Einheitsfläche

Anzahl der auf einen m ² ausgesäten Körner	Gesamt-Trockensubstanz des Strohs auf einen m ² in Gramm	Gesamtgewicht der Körner auf einen m ² in Gramm	Phosphorgehalt im Stroh auf einen m ² in mg	Phosphorgehalt in den Getreidekörnern auf einen m ² in mg	Gesamtgehalt an Phosphor in den oberirdischen Pflanzenteilen auf einen m ² in mg
400	969	233	2238	1186	3424
800	1137	275	2535	1343	3858
1200	1002	291	1913	1386	3300
1600	953	282	1400	1240	2640
2000	892	274	1384	1219	2603

spielsweise die Veränderungen des Phosphorgehaltes, dass sich dieser unter dem Einfluss einer erhöhten Dichte des Bestandes in den Getreidekörnern weniger herabsetzte, als in Blättern und Stengeln. Ebenso war auch die Gesamternte der Körner weniger herabgesetzt, als die Ernte des Stroh. (Siehe Tabelle 6.) Die gesamte Strohernte der Einheitsfläche erhöhte sich nur bei zwei- bis dreifacher Dichte des Bestandes gegenüber einer normalen Aussaat und zwar maximal um 17%, während sie bei vier- und fünfmal erhöhter Dichte stufenweise niedriger war, als bei der Kontrolle, am stärksten im letzten Falle: um 8%. Demgegenüber erhöhte sich die Getreidekörner-Ernte auf der Einheitsfläche auch bei der stärksten Bestandesdichte um 17% gegenüber der normalen Aussaat. Bei den übrigen Dichten war diese Erhöhung noch stärker, maximal bei zweifacher Dichte — um 24%. Beim Vergleiche des Verhältnisses zwischen Gewicht von Korn und Stroh fallen bei normaler Dichte auf ein Gramm Korn 4-6 g Stroh, während bei fünffacher Dichte 3-6 g Stroh auf ein Gramm Korn entfallen. Daraus ist zu ersehen, dass durch eine Erhöhung der Dichte des Bestandes die vegetativen Organe der Pflanzen geschwächer erschienen, als die Reproduktionsorgane. Ähnliche Ergebnisse führen IVANOVSKAJA (1950) und LAŠTŮVKA (1957) an.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass die Wachstumsveränderungen der oberirdischen Organe der Pflanzen von Veränderungen im Metabolismus begliktet wurden. Das ist aus der Beobachtung des Wasser-, Chlorophyll- und Phosphorgehalts ersichtlich. Um die Physiologie der gegenseitigen Beziehungen der Pflanzen in dichten Beständen tiefer verstehen zu können, wird man jedoch die Veränderungen in den Wurzelsystemen gründlicher studieren müssen, denn diese sind, wie es scheint durch eine Verdichtung des Pflanzenbestandes am meisten beeinflusst.

Literatur

- ČATSKÝ, J.: Vliv humusového uhlí (kapucínů) na minerální výživu rostlin. [Einfluss von Humuskohle (Kapuziner) auf den Mineralstoffwechsel der Pflanzen]. — Diplomarbeit der Biolog. Fak. Karlsuniversität in Prag, Lehrstuhl d. Pflanzenphysiologie, 1955.
- ERGLE, D. R. and EATON, F. M.: Aspects of phosphorus metabolism in the cotton plant. — *Plant Physiology* **33** : 100—113, 1957.
- GODNĚV, T. N.: Strojení chlorofilla i metody jeho količestvennogo opredelenija [Struktur des Chlorophylls und Methoden seiner quantitativen Bestimmung]. — Minsk, 1952.
- HOWELL, R. W.: Phosphorus nutrition of soy-beans. — *Plant Physiology* **29** : 477—483, 1954.
- IVANOVSKAJA, T. L.: Opyty s gustotoj poseva svjokly i pšenicy v svjazi s problemoj vnutrividovoj borby u rastenij [Versuche über die Aussaatdichte von Rübe und Weizen im Zusammenhang mit dem Problem des Kampfes innerhalb und ausserhalb der Arten]. — *Trudy Inst. Genetiki* **16** : 116—131, 1948.
- IVANOVSKAJA, T. L.: Opyty s gustotoj stojanija kok-saghyza i pšenicy v svjazi s isučenijem vnutrividovych i mežvidovych vzaimootnošenij u rastenij [Versuche über die Dichte des Bestandes von Kok-Saghyz und Weizen im Zusammenhang mit der Lehre der Zusammenhänge innerhalb und ausserhalb der Arten bei Pflanzen]. — *Trudy Inst. Genetiki* **18** : 100—131, 1950.
- KARANDINA, S. N.: Razvitije vschodov duba v zavisimosti ot intensivnosti ich vzaimodejstvija meždu soboj [Entwicklung der Eichenkeimlinge in Abhängigkeit von der Intensität ihrer gegenseitigen Wirkung aufeinander]. — *Dokl. AN SSSR* **89** : 733—736, 1953.
- LAŠTŮVKA, Z.: Rust a metabolismus pšenice a žita ve směsných kulturách. [Wachstum und Metabolismus bei Weizen und Korn in Mischkulturen]. — *Čs. Biol. (Praha)* **7** : 141—152, 1957.
- LYSENKO, T. D.: Agrobiologie. — Praha, 1951 [tschechische Übersetzung].

- NIKITENKO, N. A.: Nekotoryje osobennosti razvitija duba pri gnezdoj kulture [Einige Besonderheiten der Entwicklung der Eiche in Nestkulturen]. — *Agrobiologija* 3 : 146—151, 1951.
- ORLENKO, J. G.: O vzaimootnošenijach duba v gustych kulturach [Von den gegenseitigen Beziehungen der Eichenpflanzen in dichten Beständen]. — *Dokl. AN SSSR* 102 : 841—847, 1955.
- SABININ, D. A.: O vnitrovidovoj borbe v iskustvennych i jestestvennych nasaždenijach rastenij. Vnutrividovaja borba u životnych i rastenij [Vom Kampfe innerhalb der Arten in künstlichen und natürlichen Beständen der Pflanzen. Der Kampf innerhalb der Arten bei Tieren und Pflanzen]. — *Izd. MGU*. 1947.
- SAVELJEV, S. J.: K poznaniju biologičeskych zakonoměrnostij v posevach pšenicy [Zur Erkenntnis der biologischen Gesetzmässigkeiten in Weizenbeständen]. — *Agrobiologija* 1 : 122—133, 1951.
- SUKAČEV, V. N.: O vnutrividovych i mežvidovych vzaimootnošenijach sredi rastenij [Von den gegenseitigen Beziehungen innerhalb und ausserhalb der Arten zwischen den Pflanzen]. — *Bot. žurnal AN SSSR* 38 : 57—96, 1953.
- ŠMÍDOVÁ, M.: Pokusy s hnízdovým výsevem pšenice v souvislosti s vnitrodruhovými vztahy kulturních rostlin [Versuche mit nestförmiger Aussaat (Häufchensaat) des Weizens im Zusammenhang mit den Beziehungen der Kulturpflanzen innerhalb einer Art]. — *Čs. Biol. (Praha)* 4 : 480—491, 1955.
- ZAVADZKIJ, K. M.: O pričínach vypada rastenij v gnezdovych posevach različnoj plotnosti v zavisimosti ot razmerov gnezd i uslovij mineralnogo pitanija [Von den Gründen (Ursachen) des Eingehens der Pflanzen in Nestkulturen verschiedener Dichte im Zusammenhang mit den Ausmassen der Nester und den Bedingungen der Mineralstoffernährung]. — *Bot. žurnal AN SSSR* 39 : 515—544, 1954.

Anschrift des Verfassers: F. Plhák, Prom. Biol., Katedra fyziologie rostlin a genetiky, Přírodovědecká fakulta university v Brně, Brno, Kotlářská 2, ČSR.

BIOL. PLANT. 1 (4) : 248—258, 1959

Влияние густоты посева на рост, содержание воды, хлорофилла и фосфора в растениях пшеницы и ржи

ФРАНТИШЕК ПЛГАК

Кафедра физиологии растений и генетики Естественного факультета университета в Брно

Поступило 4 марта 1959 г.

Резюме

Работа проводилась с пшеницей сорта «Подборжанка» и рожью сорта «Гешновская». Опыт проходил в полевых условиях с использованием пяти различных густот посева. Самая низкая густота соответствовала обычной норме высева (400 зерен на 1 м²), самая высокая густота — в пять раз выше. В течении вегетационного периода проводилось пять измерений.

Оказалось, что повышенная густота посева неблагоприятно действовала на рост растений, причем генеративные органы ослаблялись меньше, чем вегетативные. В связи с повышенной густотой имело место понижение содержания хлорофилла, фосфора и воды в подопытных растениях, что более всего проявлялось в конце вегетации. Растения в самом густом посеве получили из почвы меньше фосфора, чем контрольные растения с нормальной густотой посева. Можно предположить, что это было вызвано значительным снижением абсорбционной способности корневой системы.

The Effect of Ethylene Chlorhydrin on Carbohydrate Metabolism in Potatoes

ANASTÁZIA GINTEROVÁ

Department of Plant Physiology, Institute of Biology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava

Received March 18, 1959

Súhrn

Mechanizmus pôsobenia etylénchlórhydrínu (v ďalšom EtClOH) v rušení dormancie zemiakových hlúz nebol doteraz osvetlený. Nakoľko sa za hlavný jeho zásah do metabolizmu považovalo posunutie rovnováhy reakcie škrob $\rightleftharpoons$ cukry vo smere hydrolýzy škrobu na voľné cukry, pokúsili sme sa v predloženej práci preštudovať dynamiku voľných cukrov a súčasne aktivitu aldolázy v zemiakoch, ovplyvnených EtClOH. Analýzy sme prevádzali vo vzorkách, odoberaných z očkových oblastí hlúz, nakoľko tu sú pri klíčení sústredené najintenzívnejšie zmeny.

Výsledky ukázali, že doterajšie názory na úlohu glycidov ako materiálu pre zvýšenú respiráciu, vyvolanú zásahom EtClOH, neodpovedajú skutočnosti, pretože pokles škrobu v zemiakových hlúzach sa v prvých fázach po aplikácii EtClOH kvantitatívne odráža vo vzostupe hodnôt voľných cukrov. Zabrzdzenie aktivity aldolázového systému zabráni ďalšiemu katabolizmu jednoduchých cukrov, uvoľnených hydrolýzou škrobu. Zaujímavá je dobrá korelácia medzi priebehom aktivity aldolázy a súčtom hladín troch kvantitatívne najvýraznejších cukrov v zemiakovej hlúze: glukózy, sacharózy a fruktózy. Ak poklesla aktivita aldolázy, zvyšuje sa hodnota súčtu voľných cukrov a naopak, keď sa aktivita aldolázy vracia k normálnym hodnotám, klesajú i hodnoty cukrov na úroveň kontroly. Z výsledkov sa vyvodzuje, že glycidy nemôžu byť v prvých fázach po ovplyvnení zemiakov EtClOH zdrojom pre krytie energetických požiadaviek klíčiacej hlúzy. Predpokladá sa utilizácia trióz a trikarbonových kyselín, teda látok, ktorých katabolizmus už na aktivite aldolázy nezávisí.

Summary

Paper chromatography was applied to the investigation of free sugars present in the vicinity of dormant potato tuber eyelets treated with ethylene chlorhydrin. At the same time aldolase activity was determined.

It was shown by the results that the present assumptions on the role of carbohydrates as material for the increase in respiration produced by ethylen chlorhydrin do not conform to actual findings, since the decrease in the starch content in potato tubers during the first phases after exposure to ethylene chlorhydrin is reflected quantitatively in the level of free sugars. The inhibition of aldolase activity prevents further catabolism of free sugars liberated by starch hydrolysis. There is a close agreement between the values of aldolase activity and the sum of the levels of the three quantitatively most important sugars in the potato tuber—glucose, sucrose and fructose. As the aldolase activity decreases the sum of free sugars increases and vice versa. On the basis of the results it is concluded that carbohydrates cannot represent the energy source for a sprouting tuber after ethylene chlorhydrin treatment. It is assumed that trioses and tricarboxylic acids are utilized, i. e. substances whose catabolism is independent of aldolase activity.

Introduction

After the stimulation of sprouting in dormant potatoes by ethylene chlorhydrin (further only EtClOH) had been discovered by DENNY (1926), the mechanism of action of this compound was taken up by a number of authors. Most papers deal with carbohydrate metabolism; according to the authors who attempted to explain the effect of EtClOH on dormant potatoes (SCHULZE and FISCHNICH 1951; PROKOSHEV 1947) one of the main causes of the dormancy-breaking effect is the interference with the equilibrium between starch and free sugars, favouring the hydrolysis of starch to produce sugars that could serve as substrates for increased respiration. However, their results do not indicate that sugars are utilized at a higher rate after EtClOH treatment. DENNY (1930) for example found a decrease in starch content of EtClOH-treated tubers by an average of 0.45% and an increase in free sugar content by 0.32%. On account of considerable variations in the results, the difference between the decrease in starch level and the increase in free sugar level is not statistically significant. Even more striking are the results of SCHULZE and FISCHNICH (1951). They give a decrease in starch level by 1.5% and increase of sucrose level by 1.55% in some cases. It could follow from the results of the above authors that the decrease in starch content is quantitatively reflected in the increase in the level of free sugars, so that the latter are not further metabolized. This suggested a parallel investigation of the changes in free carbohydrate content and aldolase activity in EtClOH-treated potatoes.

Materials and Methods

Material and experimental arrangement. Potatoes (*Solanum tuberosum* L.) of the Krasava variety were used throughout. The material was grown in our experimental garden in 1957. This variety having a relatively long vegetation period is not suitable for yielding two field crops on the same lot within a single season; however, it has a relatively long period of rest which is suitable for laboratory work and moreover, it is easily stored. Dug-out tubers were stored in a cellar. The storage temperature varied between 4 and 11° C. Medium-size tubers were used for experiments (average diameter 5—6 cm.). Treatment with EtClOH was carried out in an exsiccator. Tubers were washed in tap water to remove coarse impurities, then in distilled water. They were weighed and placed in exsiccators containing 1 ml. 40% EtClOH per kg. potatoes. The potatoes were exposed to EtClOH vapour for four days. Then the tubers were removed, placed in boxes and left for 24 hours in the open air. After that the boxes were transferred to a green-house (25—27° C) and covered with black paper

to exclude the possibility of assimilation processes. Samples were then taken from the treated potatoes during the four subsequent weeks at weekly intervals and used for analysis. Normal stored potatoes served as controls both preceding and following the experimental period. A cork-knife was used to cut out disks from the vicinity of the eyelets. From sprouting tubers the sprout was also used for analysis. The above procedure was resorted to because the distribution of substances in a potato tuber is not uniform and because the most striking changes could be expected to occur in the vicinity of the eyelets.

Experiments were carried out toward the end of 1957 and at the beginning of 1958. Control potatoes were still dormant after the termination of the experiment, as shown experimentally. In parallel with the analysis of sugars and aldolase the content of water in EtClOH-treated tubers was also determined. In agreement with other authors, no substantial changes were found in the water content. For this reason analytical results were expressed per wet weight of tissue.

Methods

Free carbohydrates: The methodical procedure was that described by Hais and Macek in their monograph (1954, p. 266—298). Since the analytical procedure was somewhat modified it will be described in detail. The weighed sample was homogenized with silica sand and extracted with 70% ethanol. The alcohol extract was evaporated to dryness at 60° C at reduced pressure. The residue was dissolved in water and placed on a Whatman 1 chromatography paper. Butanol-acetic acid was used as the mobile phase in the descending direction. Good resolution of samples was achieved after 7 days. Extracts remaining for possible repetition were preserved with benzoic acid and kept in a refrigerator. The detection of the chromatograms was carried out by passing the strip through a solution of 2% aniline in 96% ethanol, 2% diphenylamine in 96% ethanol and 80% phosphoric acid mixed at a ratio of 5 : 5 : 1. The chromatogram was then placed in a thermostat and left for 10 min. at 80° C. Quantitative determination was carried out by using an adapted photometer (according to the original arrangement of Rockland and Underwood 1956) and comparing with white paper through corresponding filters. Absolute values were then derived from calibration curves obtained in the same procedure from chromatographed standard samples. Each analysis was carried out in 8—10 parallel average samples.

Aldolase: To assay the aldolase activity a method was used based on the extraction of the enzyme from the potato tissue by redistilled water and on the measurement of fructose-1-6-diphosphate splitting under the influence of the extract. A simultaneous addition of iodoacetic acid to the incubation mixture prevents further catabolism of the decomposition products of fructose-1-6-diphosphate which can finally be estimated colorimetrically as hydrazones. Samples (about 500 mg.) were homogenized with silica sand in 10 ml. cold redistilled water. After 3 minutes of extraction the mixture was filtered and the activity of aldolase assayed in the filtrate by the above procedure. A detailed description can be found in the paper by Trlifajová et al. (1956). Aldolase activity is expressed in relative units equal to $10^2 \times$ extinction, measured against a blank. Four to six parallel samples were used for individual analyses.

The results were treated statistically by using the *t*-test for small populations. Results corresponding to $p < 0.05$ were considered significant. The standard deviation of the mean ($s_{\bar{x}}$) is represented in the graphs by a vertical intercept for each value.

Results

Free sugars: The level of sucrose was affected by EtClOH particularly in the first three weeks. The first week was marked by a sharp and very significant increase. As compared with control tubers which contained 6.8 mg. sucrose per 1 g. fresh weight of tissue, the content here increased to 14.8 mg. which represents a change of more than 100%. The increase became even

more marked during the second week — the sucrose content rose to 16.1 mg. After the second week a sharp decrease was observed which generally persisted until the end of experiment. The changes in sucrose level during sprouting of dormant potato tubers treated with EtClOH are shown in Fig. 1.

The content of fructose changes in a similar way to that of sucrose. Immediately after EtClOH treatment its level rose but decreased again during

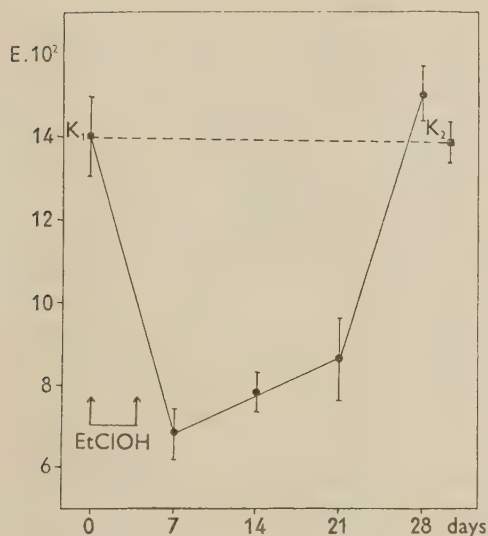


Fig. 1. Changes in sucrose level of eyelet parts of potato tubers treated with EtClOH during sprouting.

Fig. 3. Changes in glucose level of eyelet parts of potato tubers treated with EtClOH during sprouting.

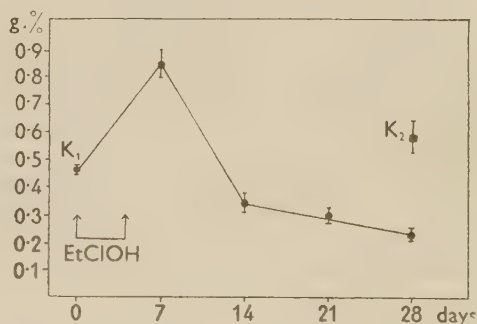
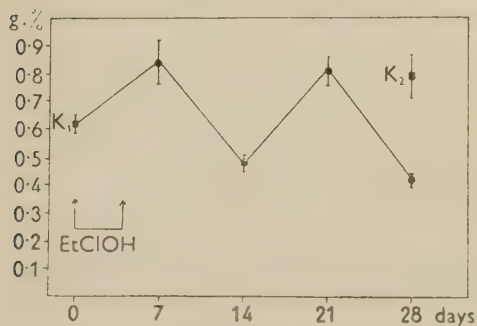
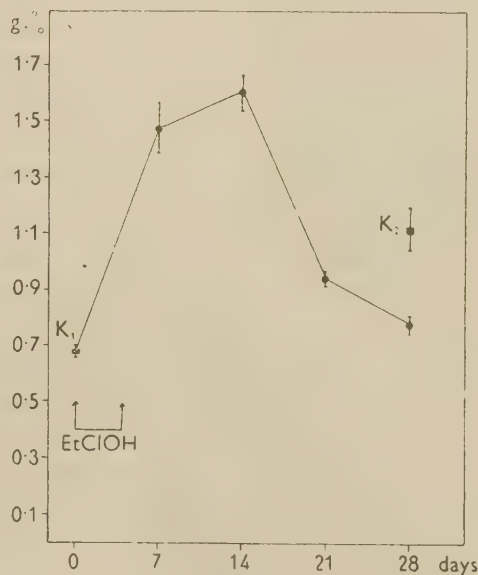


Fig. 2. Changes in fructose level of eyelet parts of potato tubers treated with EtClOH during sprouting.

Fig. 4. Changes in aldolase activity of eyelet parts of potato tubers treated with EtClOH during sprouting. Aldolase activity is expressed in relative extinction units.



the second week; at the end, the fructose content was less than in the control tubers, as shown in Fig. 2.

The greatest EtClOH-induced variations were observed in the content of glucose. As shown in Fig. 3 an alternating rise and fall in glucose level was observed.

Aldolase: The changes in aldolase content of potato tubers treated with EtClOH are shown in Fig. 4. It follows from the diagram that EtClOH brings about a sharp decrease in aldolase activity. In the following weeks the activity begins to rise somewhat and during the fourth week, when potatoes sprout intensely aldolase activity rises sharply to the original value observed in the untreated tubers. Analysis of control samples at the end of the experiment (K_2) as well as orientation analysis of control potatoes in the course of the experiment revealed that no change in aldolase activity takes place during the five weeks.

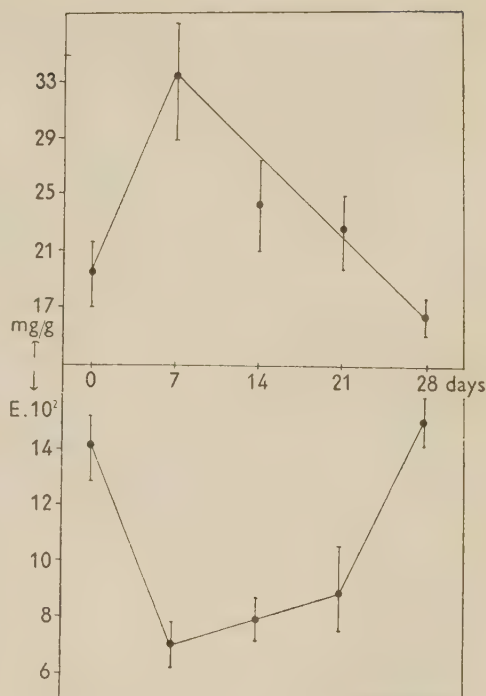
The content of free sugars in control potatoes rose generally, which is in agreement with the data in the literature. The increase was gradual and for the whole duration of five weeks it was just about significant as compared with the control analysed before the experiment, as shown in the Figures.

Discussion

In agreement with the data of many authors and of this communication EtClOH brought about an increase in the free sugar content of potatoes. The increase was especially striking in the case of sucrose from the work of SCHULZE and FISCHNICH (1951) and of DENNY (1930). On account of reducing substances DENNY could not decide whether EtClOH treatment produces an increase or decrease as he obtained alternately higher and lower results than in the control. It was shown in our analysis that these results are due to a great variation in glucose content whereas fructose content changes similarly to that of sucrose. It is interesting that fructose is the first sugar which undergoes a decrease in the increased level, to values below that of the control. Changes observed with glucose cannot be interpreted on account of their great variation. It can only be assumed that the effect of EtClOH on carbohydrate metabolism is much more pronounced than was postulated by previous authors.

On the other hand the sharp decrease in aldolase activity during the first phase after EtClOH treatment is rather surprising. All authors studying the mechanism of action of EtClOH assume that the latter brings about first an increased catabolism of carbohydrates which could meet the energy requirements of EtClOH-induced sprouting. Our finding of a sharp decrease in aldolase activity immediately after EtClOH treatment is in contradiction to the above assumption. Aldolase occupies an almost central position in the anaerobic phase of carbohydrate metabolism as it catalyzes the splitting of the six-carbon hexose skeleton liberated by the phosphorylase of starch. It follows from the results of our experiments that carbohydrate catabolism is strongly inhibited during the first phase following EtClOH treatment so that phos-

Fig. 5. Representation of the mutual relationship between aldolase activity (lower part) and concentration changes of free sugars (upper part) in the course of potato tuber sprouting, after EtClOH treatment. The data for total free sugar were obtained by adding the data for glucose, fructose and sucrose, as determined by quantitative chromatography.



phorylated hexoses from starch decomposition are catabolized much more slowly during further phases of carbohydrate breakdown. Contrary to the views of older authors the conclusion must be reached that the increase in catabolic processes after EtClOH treatment, displayed by increased respiration, is not produced by the carbohydrate component of reserve substances. The results of DENNY and SCHULZE and FISCHNICH mentioned in the introduction pointed to this fact as the increase in the mono- and disaccharide content

of EtClOH-treated potatoes corresponded quantitatively to the decrease in the starch content. As the above authors did not interpret the changes from the quantitative point of view they reached erroneous conclusions.

The upper part of Fig. 5 shows the changes in the sum of the three quantitatively most important sugars in a potato tuber—glucose, fructose and sucrose. If the curve representing these changes is compared with the changes in aldolase activity (the lower part of Fig. 5) it can be seen that there is a close correlation between the two processes. The following explanation may be offered: EtClOH activates systems catalyzing starch breakdown. This effect on amylase was confirmed experimentally by DENNY (1932). Consequently a relatively large amount of glucose is liberated which cannot be catabolized further as the activity of aldolase which catalyzes further breakdown of glucose is diminished. It follows that the mono- and disaccharide content of potato tubers increases (systems catalyzing the breakdown of sucrose to glucose and *vice versa*, just as the dephosphorylation enzymes appear not to be affected by EtClOH). As soon as the aldolase activity begins to return to normal (during the second week after exposure to EtClOH) the accumulated mono- and disaccharides are catabolized and their levels decrease. During the fourth week of the experiment when the aldolase activity is about the same as in control tubers the sum of free carbohydrates decreases to a level approaching that of the controls.

If the findings of SMITH (1929), MILLER (1933) and RANJAN and KAUR

(1954) are considered (EtClOH causes an increase in respiration) along with our findings that the aldolase system is strongly inhibited by EtClOH *in vivo* the question arises as to the source of carbon to account for the increased production of carbon dioxide and for the energy required by a dormancy-breaking potato tuber.

GUTHRIE (1934) found that EtClOH brings about a sharp decrease in citric acid content in potato tubers. On account of the fact that no increase in proteolysis is observed during the first phase of the experiment (GINTEROVÁ 1959) and that sugar metabolism is blocked, it may be assumed that immediately after the exposure to EtClOH substances are metabolized which are broken down independently of aldolase, namely trioses and tricarboxylic acids, later joined by amino acids and proteins (GINTEROVÁ 1959).

It is likely that the decrease in aldolase activity, along with some other changes in the metabolism of potato tubers (change of the equilibrium between ascorbic and dehydroascorbic acid, activation of transamination processes and of reductive amination of alpha-keto acids, sharp rise in the level of hydroxy amino acids and others (GINTEROVÁ 1959) represents one of the primary consequences of EtClOH treatment which is accompanied by a number of secondary effects.

References

- DENNY, F. E.: Hastening the sprouting of dormant potato tubers. — *Amer. J. Bot.* **13** : 118—125, 1926.
- DENNY, F. E.: Sucrose and starch changes in potatoes treated with chemicals that break the rest period. — *Amer. J. Bot.* **17** : 806—817, 1930.
- DENNY, F. E.: Direct versus indirect effects upon potato amylase by chemicals which induce sprouting of dormant potato tubers. — *Contrib. Boyce Thompson Inst.* **4** : 53—63, 1932.
- GINTEROVÁ, A.: Mechanizmus pôsobenia etylénchlórhydrínu na dormantné hlúzy *Solanum tuberosum* [The mechanism of action of ethylene chlorhydrin on dormant tubers of *Solanum tuberosum*]. — *Biologické práce* (Bratislava) 1959 (in press).
- GUTHRIE, J. D.: Metabolism of citric, sulphuric and nitric acid in the potato tuber. — *Contrib. Boyce Thompson Inst.* **6** : 247—268, 1934.
- HAIS, I. M., MACEK, K.: Pápiová chromatografie [Paper chromatography]. — Praha 1954.
- MILLER, L. P.: Effect of various chemicals on the sugar content, respiratory rate and dormancy of potato tubers. — *Contrib. Boyce Thompson Inst.* **5** : 213—234, 1933.
- PROKOSHEV, S. M.: Biokhimiya kartofelya [Biochemistry of potato]. — Moskva-Leningrad 1947.
- RANJAN, S., KAUR, R.: Respiratory responses in potato tubers an index of the effect of ethylene chlorhydrin and ammonium thiocyanate. — *J. exp. Bot.* **5** : 414—420, 1954.
- ROCKLAND, L. B., UNDERWOOD, J. C.: Rapid procedure for estimation of aminoacids by direct photometry on filter paper chromatograms. Estimation of seven free aminoacids in orange juice. — *Anal. Chem.* **28** : 1679—1684, 1956.
- SCHULZE, W., FISCHNICH, O.: Über Keimförderung und stoffliche Veränderungen in der Kartoffelknolle bei Beginn und im Verlauf der Keimung. — Hannover 1951.
- SMITH, O.: The effect of various treatments on the carbon dioxide and oxygen in dormant potato tubers. — *Hilgardia* **4** : 273—306, 1929.
- TRILFAJOVÁ, J., RAMPAS, J., KREDBA, V.: Naše první zkušenosti s aldolasovým testem [Our first experiences with the aldolase test]. *Čas. lékaři čes.* (Praha) **95** : 267—270, 1956.

Address: A. Ginterová, Prom. Chem. Ústředný výzkumný ústav potravinárskeho priemyslu Miletičova 14/B, Bratislava.

Влияние этиленхлоргидрина на углеводный метаболизм клубней картофеля

АНАСТАЗИЯ ГИНТЕРОВА

Отдел физиологии растений, Биологический институт
Словацкой Академии Наук, Братислава*Поступило 18 марта 1959 г.*

Резюме

Механизм действия этиленхлоргидрина (EtClON) на прекращение периода покоя клубней картофеля не был до сих пор объяснен. Так как считалось, что его влияние на метаболизм картофеля заключается, главным образом, в сдвиге равновесия реакции крахмал-сахара в направлении гидролиза крахмала в свободные сахара, мы попытались в настоящей работе исследовать динамику свободных сахаров и одновременно активность альдозазы в растениях картофеля, обработанных EtClON . Образцы для исследования брались из области глазков на клубнях, так как здесь в период прорастания происходят интенсивные процессы.

Результаты анализов показали, что старые взгляды, согласно которым углеводы являются субстратом для повышенного дыхания, вызванного действием EtClON , не отвечают действительности. На самом деле, снижение количества крахмала в клубнях картофеля в первое время после применения EtClON количественно проявляется в повышении содержания свободных сахаров. Торможение активности системы альдозаз препятствует дальнейшему катаболизму простых сахаров, образующихся при гидролизе крахмала. Интересна корреляция между ходом кривой активности альдозазы и общим содержанием в количественном отношении наиболее важных сахаров в клубне картофеля: глюкозы, сахарозы и фруктозы. Как только понизилась активность альдозазы, повышается общее содержание свободных сахаров и, наоборот, когда активность альдозазы возвращается к норме, понижается содержание сахаров до уровня контроля. Из результатов выходит, что названные углеводы в первое время после обработки картофеля EtClON не могут служить источником добавочной энергии, необходимой для прорастающего клубня. Предполагается использование триоз и трикарбоновых кислот, то есть веществ, катаболизм которых не зависит от активности альдозазы.

Evaluation of Experimental Results by Using Graphs with Conjugate Scales

MILOŠ ŠPURNÝ

Institute for Oil Research, Brno

Received March 20, 1959

Souhrn

Při grafickém zobrazování vztahů tří i více závisle proměnných veličin se osvědčilo konstruovat grafy s doplňkovými sítěmi, které mají jisté znaky společné s nomogramy.

Princip navrhovaného grafického vyhodnocování je detailně probrán na konkrétních příkladech. Doporučujeme používat této grafické metody především v biologické praxi, neboť v tomto oboru musíme převážně pracovat s empiricky zjištěnými vztahy, pro které je obtížné nalézt matematický výraz, který by vedl ke konstrukci pravého nomogramu; výhoda doporučeného způsobu je v tom, že můžeme z výsledného grafu (nomogramu) přehlédnout vztahy mezi všemi sledovanými veličinami.

Summary

In evaluating graphically the relationships between three or more dependent variables it was found useful to construct graphs with complementary systems of co-ordinates which have certain properties in common with nomographs. It is therefore recommended that this method should be applied in practical biology as it is often necessary to work with empirically determined relationships for which it is difficult to obtain a mathematical expression suitable for constructing a true nomograph. The advantage of the proposed procedure consists in the fact that the resulting diagram (nomograph) depicts the relationships between all the data investigated.

Introduction

The clarity of diagrams makes it possible to get a more comprehensible picture of experimental results than tabular data; this holds for the commonly used graphical representation of elementary relationships between two variables, e. g. $y = k \cdot x$, $y = f(x)$ and the like. A more complex solution of biological problems, however, compels the investigator to study several variables simultaneously so that more complicated graphical expressions cannot be done away with. In order to preserve the clarity of graphical representation partial diagrams are frequently constructed which depict only the relation of two variables, the general picture being obtained only on examining a number of partial diagrams; otherwise the method of spatial diagrams is resorted to. The former process is a laborious one, the latter produces diagrams which are frequently difficult to understand and interpret [just as their plane projection containing horizontal iso-lines (Byzov 1955) is difficult to decipher when studying non-monotonous relationships].

It is the author's opinion that it is useful—in examining the relations of three or more dependent variables—to give up the “clear” graphical representation of results and to resort to the method of summarizing experimental data in a form resembling graphs with complementary systems of co-ordinates (Byzov 1955); by this co-ordinates are meant which possess certain features in common with nomographs, since the directly apparent representation of quantitative data is converted into indirectly interpretable conjugate-scale nomographs intended for carrying out numerical operations (GLAGOLEV 1936; NEVSKY 1951; SCHMID et al. 1957). This form appears to be particularly convenient in those cases when it is necessary to work with empirical relations for which it is difficult to find a mathematical expression that could be transformed into a true nomograph.

The principle of graphical representation of this type can be expressed as follows: Partial graphs are constructed in such a way that one independent variable is always kept constant and then gradually superimposed on a single graph. The principal scales of the resulting diagram (nomograph) are designated with values of the variable, the changes of which are the primary object of study. The values of the other variables are located on conjugate scales. If the number of dependent variables is higher it is convenient to plot those conjugate scales which could produce confusion in the nomograph on transparent sheets with a system of co-ordinates.

The submitted communication contains examples of the application of the graphical method of representation by using conjugate scales to provide evidence of the advantages of the described procedure in evaluating experimental results.

Examples of Graphical Solution

Example 1.

Assignment: To develop a method of quantitative determination of sulphate-reducing bacteria in hydrogen sulphide mineral waters; the principle of the method consists in comparing production curves of hydrogen sulphide in the waters examined, with standard production

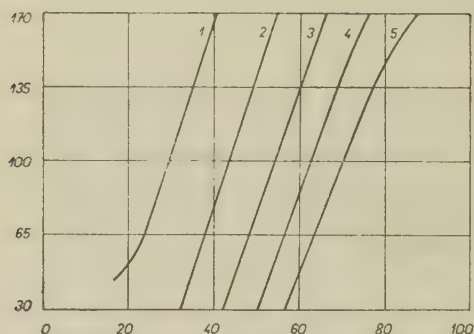


Fig. 1. Production curves of hydrogen sulphide in cultures of sulphate-reducing bacteria, infected at ratio $D : I = 10 : 1$. Abscissa: length of cultivation in hours; ordinate: hydrogen sulphide production in mg./l. 1 — 10^8 D/ml. culture, 2 — 10^6 D/ml. culture, 3 — 10^5 D/ml. culture, 4 — 10^4 D/ml. culture, 5 — 10^3 D/ml. culture.

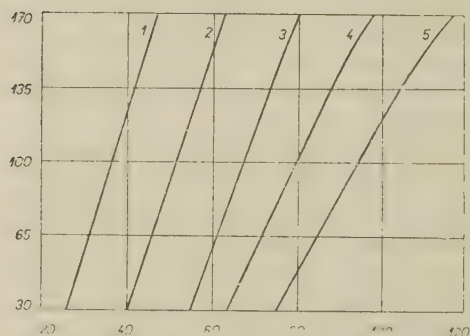


Fig. 2. Production curves of hydrogen sulphide in cultures of sulphate-reducing bacteria, infected at ratio $D : I = 8 : 1$. Abscissa: length of cultivation in hours; ordinate: hydrogen sulphide production in mg./l. 1—5 : 10^7 — 10^3 individuals of D per ml. culture.

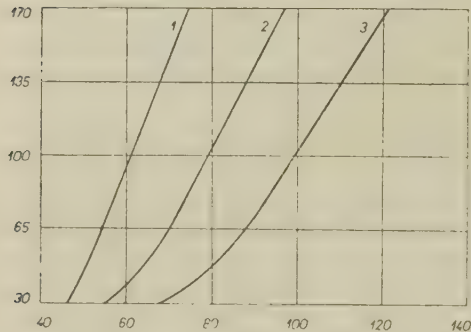


Fig. 3. Production curves of hydrogen sulphide in cultures of sulphate-reducing bacteria, infected at ratio $D : I = 4.7 : 1$. Abscissa: length of cultivation in hours; ordinate: hydrogen sulphide production in mg./l. 1—3 : 10^6 — 10^4 individuals of D per ml. culture.

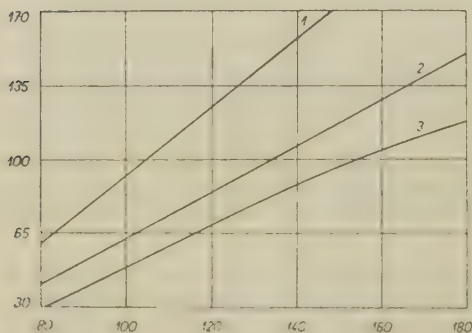


Fig. 4. Production curves of hydrogen sulphide in cultures of sulphate-reducing bacteria, infected at ratio $D : I = 3.4 : 1$. Abscissa: length of cultivation in hours; ordinate: hydrogen sulphide production in mg./l. 1—3 : 10^6 — 10^3 individuals of D per ml. culture.

Fig. 5. Production curves of hydrogen sulphide in cultures of sulphate-reducing bacteria, infected at ratio $D:I = 2:3:1$. Abscissa: length of cultivation in hours; ordinate: hydrogen sulphide production in mg./l. 1— $3 \cdot 10^5$ — 10^3 individuals of D per ml. culture.

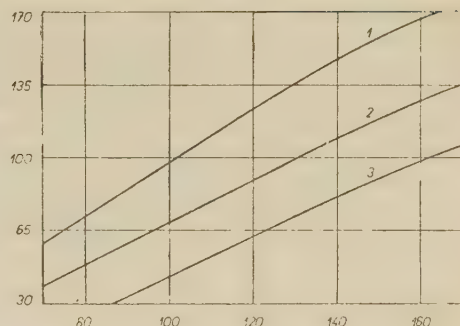


Fig. 6. Production curves of hydrogen sulphide in cultures of sulphate-reducing bacteria, infected at ratio $D:I = 1:2:1$. Abscissa—length of cultivation in hours; ordinate: hydrogen sulphide production in mg./l. 1 — 10^7 D/ml., 2 — 10^6 D/ml culture, 3 — 10^4 D/ml culture, 4 — 10^2 D/ml. culture.

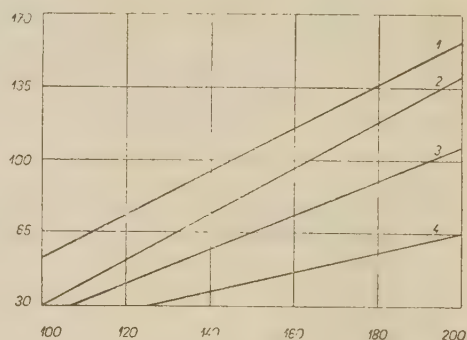


Fig. 7. Rate of production of hydrogen sulphide depends on the number of cells of D and on the degree of infection of cultures used. Abscissa: log number of D/ml. culture; ordinate: rate of hydrogen sulphide production, expressed by the slope of production curves. The degree of infection of individual cultures is given for each straight line as the $D:I$ ratio.

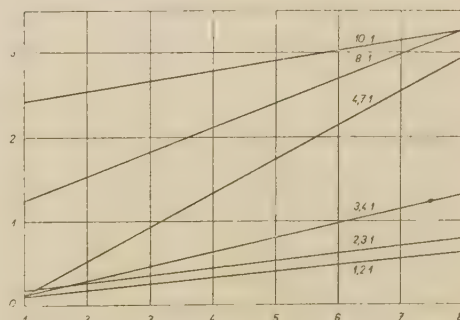
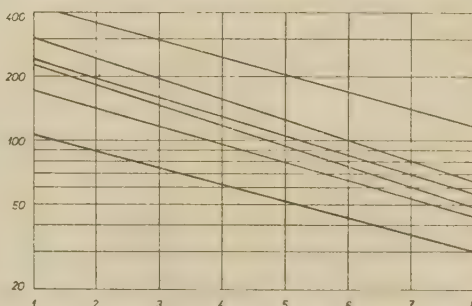


Fig. 8. Relation of length of cultivation required for a standard production of hydrogen sulphide (100 mg./l.) to the number of sulphate-reducing bacteria in cultures with various degrees of infection. Abscissa: log number of D; ordinate: length of cultivation in hours required to obtain a production of 100 mg. H_2S /l., values of t from Table 1. Degree of infection of cultures, expressed by the $D:I$ ratio: 1 — $10:1$, 2 — $8:1$, 3 — $4.7:1$, 4 — $3.4:1$, 5 — $2.3:1$, 6 — $1.2:1$.



curves obtained from cultures of sulphate-reducing bacteria containing a known number of cells per ml. (experimental values are taken from SPURNÝ et al., 1956). The following data were obtained in growth experiments and from the determination of the number of cells in mixed cultures of sulphate-reducing bacteria (D):

The form of the production curves of hydrogen sulphide in D cultures depends first of all on the total number of cells of D in the culture and then on its purity, expressed as D : I, where I is the number of contaminating micro-organisms per ml. culture (SPURNÝ et al., 1957). Production curves obtained in the individual experiments are shown in Figs. 1—6; judging from the data contained in the tables of the above paper (SPURNÝ et al., 1957) the curves are probably logarithmic in character. They were not anamorphosed to straight lines because only a short section, practically linear, was considered here.

Graphical solution and conjugate-scale nomograph construction

a) Figs. 1—6 serve for the evaluation of slopes of individual curves characterizing the rate of production of hydrogen sulphide in the form of the ratio $y : x$, where y is taken for constant (for the production of 65—135 mg. $H_2S/l.$) and x is the time interval corresponding to the given production of hydrogen sulphide. Values on both scales were read in diagrams with a linear scale where 1 hr. = 1.5 mg. $H_2S/l.$ At the same time the length of cultivation for a chosen standard production of hydrogen sulphide (100 mg. $H_2S/l.$) was found, representing an important characteristic of the production curves. Both values are shown in Table 1.

Table 1. Slopes of hydrogen sulphide production curves (from Fig. 1—6) in cultures containing a given number of sulphate-reducing bacteria (log D) of a given degree of contamination, expressed as D : I; the value of t gives the rate of hydrogen sulphide production in hours (100 mg. $H_2S/l.$)

log D	D : I											
	10 : 1		8 : 1		4.7 : 1		3.4 : 1		2.3 : 1		1.2 : 1	
	slope x/y	t	slope x/y	t	slope x/y	t	slope x/y	t	slope x/y	t	slope x/y	t
8	3.11	29.5										
7			3.25	36.5							0.52	145.0
6	3.04	43.5	3.04	51.5	2.50	61.5					0.54	164.0
5	2.91	54.0	2.70	67.5	2.00	79.0			0.64	102.0		
4	2.80	62.5	2.20	80.5	1.58	98.0	0.80	107.0	0.47	130.5	0.41	192.5
3	2.64	70.5	2.00	97.0			0.54	134.0	0.45	161.5		
2							0.45	154.0			0.21	300

b) The values of production curve slopes were plotted in relation to the logarithm of the number of D in cultures variously infected by I (Fig. 7).

c) Then a conjugate scale for the number of I individuals is plotted in Fig. 7. In Fig. 7, points of intersection of the line D : I = 1 : 1 with the intercepts of log number of D define points where the number of D and I are identical; points of intersection of the straight line for the ratio D : I = 10 : 1 with the intercepts of log number of D represent points where the number of D is always one order higher than the number of I. Then the log number of I for the above points is determined and the points are connected with the points of the same number of I on the straight line for D : I = 1 : 1 (actually the ratio 1.2 : 1 was taken). The connecting curves are logarithmic and form in the graph a second conjugate scale—iso-line of the log values of I (Fig. 9).

d) Into Fig. 7 a third conjugate scale is introduced from which the time of production of a standard amount of hydrogen sulphide (100 mg. $H_2S/l.$) in hours can be derived. The time of standard production of hydrogen sulphide (t values in Table 1) is plotted in the graph against the number of D in variously infected cultures (Fig. 8). From this diagram intersection points

of time ordinates with the scale of log number of D in cultures with various D : I ratios, are transferred to the system of co-ordinates of graph 7 (Table 2); points of identical production time are connected and a conjugate scale of production iso-lines obtained (Fig. 10).

e) All scales are superimposed in Fig. 7 and the final nomograph is obtained (Fig. 11).

An example of using the nomograph: The value of slope derived from the H_2S production curve (2.0) and the number of I cells (according to plate analysis) ($1 \cdot 10^3$) are given. At first the intersection point of the straight line with slope 2.0 with the curve of log number of $I = 1 \cdot 10^3$ is found, from this point a perpendicular suspended to the abscissa and the value of log number of D is read, in this case $7 \cdot 10^3$; this gives the value of $D:I = 7:1$. At the same time the intersection point of the slope straight line with the time system curves is determined; in this case it can be found that the production of 100 mg. H_2S/l . was achieved within 103 hours.

Example 2.

Assignment: To study the effect of decreasing soil humidity on flax plants during the germination phase; to examine the decrease in growth rate (A), stopping of growth (B) and lasting wilting (C) of flax seedlings growing in soils of varying humidity. Experimental data can be found in the paper by PENKA (1956, Table 5, Fig. 7, 8, 9).

Graphical solution and conjugate-scale nomograph construction

a) Partial graphs are drawn on the basis of the data from Table 5 of the paper quoted above; the first graph relates cultivation time to drying out of the used types of soils (in percentage humidity), the second graph relates cultivation time to the growth of experimental plants (Figs. 12 and 13). The points of critical soil humidity and of corresponding physiological characteristics are marked on the individual curves.

b) In Fig. 12 a time extrapolation is carried out; a scale of soil humidity during drying out is plotted on the abscissa, the original soil humidity on the ordinate. Into this co-ordinate system soil humidity values are plotted as observed within 1—20 hours of drying; thus a conjugate scale of hour iso-lines is obtained (the system of curves 0—20 in Fig. 15).

c) A graph of iso-lines for the plant length is constructed by transferring the values from Fig. 13 into a transformed system of coordinates. Time of cultivation in hours is plotted on the abscissa and per cent humidity of soils used for plant growth on the ordinate. Points corresponding to the same time of cultivation are connected and a system of hour iso-lines is obtained (Fig. 14).

d) Both conjugate scales are transferred to the final nomograph (Fig. 15); this shows the changes

Table 2. Number of sulphate-reducing bacteria in cultures with different D : I ratios, derived by time extrapolation from graph No. 8 for the purpose of constructing conjugate scales of hydrogen sulphide production

D : I		<i>t</i> -standard production of hydrogen sulphide in hours (100 mg. H ₂ S/l.)										
		30	40	50	60	70	80	90	100	120	150	200
10 : 1	8. 10 ⁷	2.4. 10 ⁸	1.5. 10 ⁵	1.3. 10 ⁴	2. 10 ³	3.6. 10 ²	8. 10 ¹	2.1. 10 ¹	—	—	—	—
8 : 1	—	—	2.1. 10 ⁷	2.3. 10 ⁶	4.2. 10 ⁵	9. 10 ⁴	2. 10 ⁴	6. 10 ³	6.8. 10 ²	4.8. 10 ¹	—	—
4.7 : 1	—	—	7.1. 10 ⁷	1.1. 10 ⁷	2.2. 10 ⁶	5.4. 10 ⁵	1.7. 10 ⁵	5.3. 10 ⁴	7.8. 10 ³	7.2. 10 ²	—	4. 10 ¹
3.4 : 1	—	—	—	4.5. 10 ⁷	8.5. 10 ⁶	2.1. 10 ⁶	5.3. 10 ⁵	1.6. 10 ⁵	2.2. 10 ⁴	1.8. 10 ³	—	8. 10 ¹
2.3 : 1	—	—	—	—	4. 10 ⁷	1.1. 10 ⁷	3.1. 10 ⁶	1. 10 ⁶	1.5. 10 ⁵	1.6. 10 ⁴	—	8. 10 ²
1.2 : 1	—	—	—	—	—	—	—	—	7. 10 ⁷	4.3. 10 ⁶	—	1.3. 10 ⁵

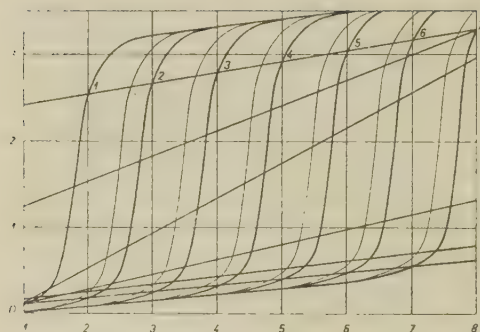


Fig. 9. Graph 7 plus a conjugate scale of iso-lines for log number of I. Abscissa: log number of D/ml. culture; ordinate: slopes of hydrogen sulphide production curves. Log number of I is marked for each curve.

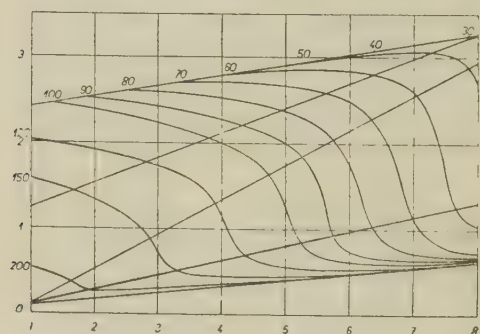


Fig. 10. Graph 7 plus a conjugate scale of iso-lines for the length of cultivation required for standard production of hydrogen sulphide (100 mg./l.). Abscissa: log number of D/ml. culture; ordinate: slopes of production curves of hydrogen sulphide. Length of cultivation in hours is given for each curve.

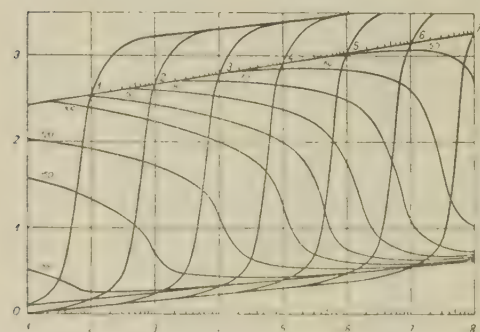


Fig. 11. Nomograph for evaluation of number of cells of D in hydrogen-sulphide mineral waters. Abscissa: log number of D/ml. water; ordinate: slopes of hydrogen sulphide production curves. Curves with the scale 1—7 show the log number of I/ml. water; curves with scale 50—200 show length of cultivation in hours required for standard production of hydrogen sulphide (100 mg./l.). An example of using nomograph is given in text.

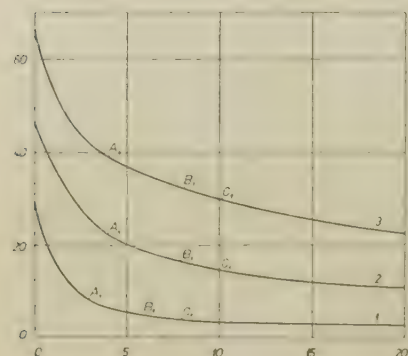


Fig. 12. Drying-out curves of soils. Abscissa: length of drying-out in hours; ordinate: soil humidity in %. 1 — sandy soil, 2 — clayey soil, 3 — loamy soil (according to Penka, 1956).

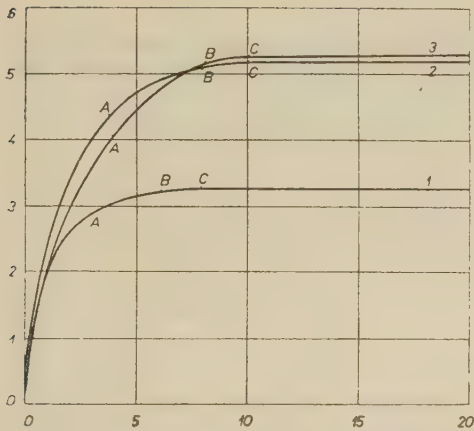


Fig. 13. Growth of flax in germination phase in soils exposed to drying. 1 — sandy soil, 2 — clayey soil, 3 — loamy soil. Abscissa: length of cultivation in hours; ordinate: length of plants in cm. A — decrease in growth rate, B — stopping of growth, C — lasting wilting (according to Penka, 1956).

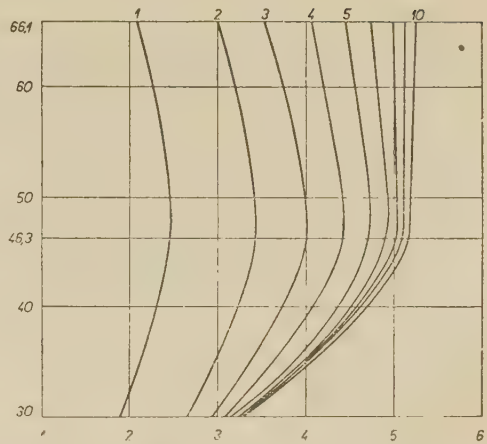


Fig. 14. Diagram of iso-lines for length of flax seedlings, obtained by redrawing values from Fig. 13 into changed co-ordinates. Abscissa: length of seedling in cm.; ordinate: % humidity of soils used for cultivation of plants. Scale values 1—10 denote length of cultivation in hours.

Fig. 15. An evaluation nomograph for the study of effect of soil humidity on growth of flax in germination phase. Abscissa: changes of soil humidity in %; ordinate: original soil humidity in %. System of light-drawn curves (scale of values from 0 to 20) denotes duration of experiment in hours, system of heavy-drawn curves represents conjugate scale for plant growth in cm. (scale of values between 2 and 5). Dot-and-dashed straight lines A, B, C represent physiological characteristics: decrease in growth rate, stopping of growth and lasting wilting of plants. An example of using nomograph is given in text.

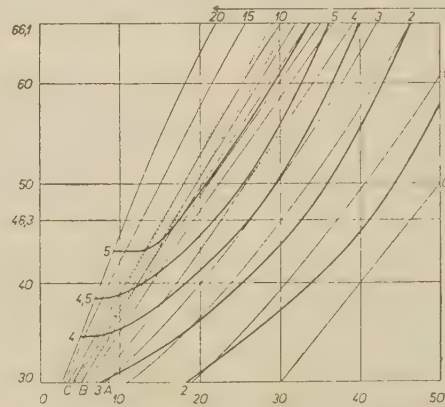
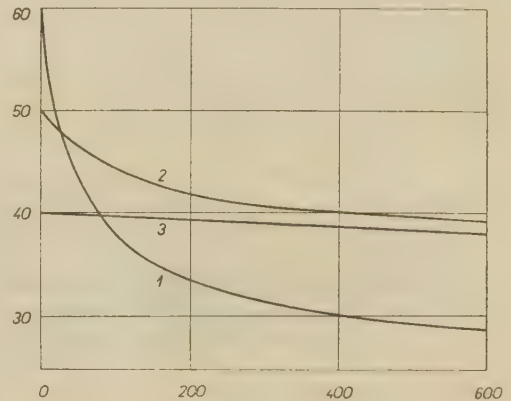


Fig. 16. Decrease in oil saturation of samples of unconsolidated silica sand after passage of water. Abscissa: amount of passing water in ml.; ordinate: oil saturation of sand samples in % pore volume. 1 — samples saturated to 60%, 2 — samples saturated to 50%, 3 — samples saturated to 40%.



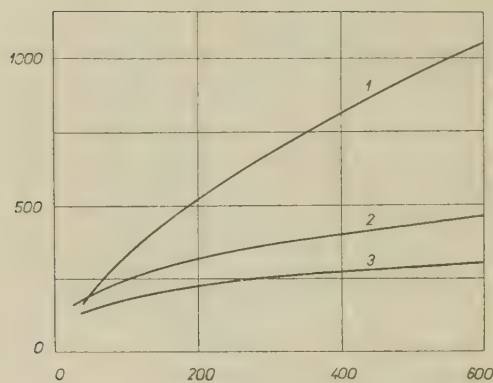


Fig. 17. Changes of water permeability of sand samples saturated with oil to 60% (1), 50% (2), and 40% (3) after passage of water. Abscissa: amount of passing water in ml.; ordinate: actual permeability in md.

Fig. 18. Fig. 17 redrawn into a changed system of co-ordinates. Abscissa: actual permeability of samples in md.; ordinate: original oil saturation of samples in % pore volume. Curves connect points of identical amount of passing water (given in ml. for each curve).

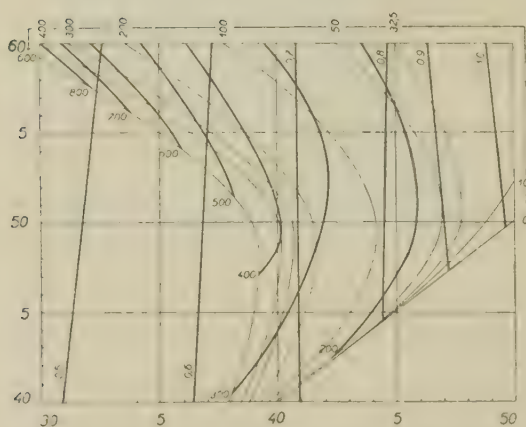
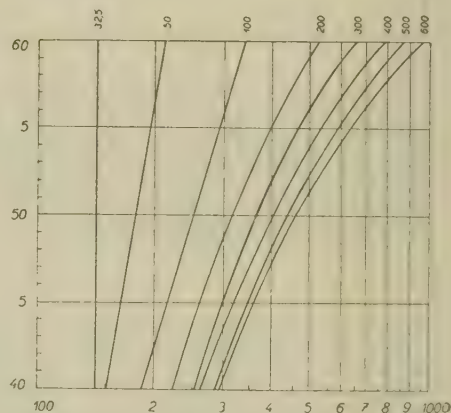


Fig. 19. The release of oil in relation to the original oil saturation of samples and to their permeability for distilled water. Abscissa: oil saturation of samples in % pore volume after passage of water; ordinate: the original oil saturation of samples in % pore volume.

1st conjugate scale (lightly drawn) is represented by iso-lines of water passage; ml. given for each curve;

2nd conjugate scale (heavily drawn) is represented by iso-lines of actual permeability in md.;

3rd conjugate scale (heavy-drawn straight lines) is represented by iso-lines of oil: water ratios.

An example of using the nomograph is given in text.

in humidity of the soil types used during drying out over a period of 1—20 hours (depending on the conditions of humidity and temperature) as well as the plant growth expressed in the stem length in cm.; in addition, zones bounded by dot-and-dashed lines define the physiological state of plants caused by their water regime.

An example of using the nomograph: Flax seedlings are planted in a clay-sand soil of 46.3% humidity (read on the ordinate); within five hours of drying out under the given conditions (read on the system of light-drawn curves) the soil humidity decreases to 19% (from the intersection point of the ordinate for 46.3% humidity and of the curve for 5 hours a perpendicular is suspended to the abscissa, giving a humidity of 19%). At this soil humidity the plants were 4.8 cm. long (derived from the system of heavy-drawn curves—the value was obtained by interpolation between the 4.5 cm. and 5.0 cm. curves); at the same time it can be observed that the plants grew more slowly than the controls (the found intersection point lies in the zone bounded by A and B).

Example 3.

Assignment: In order to evaluate conclusively the effect of bacteria or of bacterial culture extracts on the release of oil from oil-bearing rocks it is necessary to investigate the changes in their physico-chemical parameters during flow of water, i. e. to examine the process of release in control and experimental series. Changes in parameters (actual permeability, porosity, two phases system in rock sample micro-structure) after flow of water are to be incorporated in a single graph (nomograph).

Experimental data and other material was obtained from a previous paper (SPURNÝ, 1959); the results obtained are compiled in primary diagrams (Figs. 16 and 17). The first shows the changes in oil saturation of samples after passage of water in relation to the original oil-water ratio in rock microstructure; the second graph represents changes in actual water permeability of rock samples during oil displacement.

Graphical solution and conjugate-scale nomograph construction:

a) Fig. 16 is redrawn in a co-ordinate system in which the original oil saturation of rock samples is plotted on the ordinate and saturation after passage of water on the abscissa; in this system points are plotted denoting the amount of passing water, in integers. Points expressing the same amount of passing water are connected and a conjugate scale is obtained (in Fig. 19 the system of light-drawn curves with a scale from 0 to 600 ml.).

b) In order to superimpose more easily the conjugate scale for the changes of actual water permeability of samples Fig. 17 is redrawn into the transformed co-ordinate system: permeability is plotted on the abscissa and the original oil saturation of samples (Fig. 18) on the ordinate. Into this system points are plotted denoting the amount of passing water in integers; points of identical amount of passing water are connected and iso-lines for the amount of passing water in ml. obtained.

c) The conjugate scale for actual permeability to water from the values of Fig. 18 is transferred to Fig. 19. The intersection points of intercepts for integral permeability values with passing-water iso-lines are determined in Fig. 18 and at the same time the corresponding value of original oil saturation on the ordinate is noted. The points thus determined are transferred to the system of Fig. 19, points of identical permeability are connected and a conjugate scale for actual water permeability of rock samples is obtained. In addition, another conjugate scale can be included in the Fig. 19 system by an analogous procedure, namely that for the oil-water ratio in core samples (the series of heavy-drawn straight lines for values from 0.5 to 1.0, in Fig. 19).

An example of using the nomograph 19:

Through a rock of given porosity saturated with oil to 55% pore volume (on the ordinate) pass 100 ml. of water, i. e. 24 times the pore volume (on the scale of light-drawn curves). At the same time the oil saturation of the sample decreases to 42.0% pore volume (on the abscissa): the oil : water ratio decreases from the original value of 1.2 to 0.73 (on the scale of heavy-drawn straight lines). In this physico-chemical state of phases in rock micro-pores the actual permeability to water decreases to 290 md. (on the scale of heavy-drawn curves).

References

- BYZOV, L. A.: Grafické metody v plánování, statistice a evidenci [Graphical methods in planning, statistics and evidence]. — Praha 1955.
- GLAGOLEV, N. A.: Teoretické základy nomografie [Theoretical principles of nomography]. — Praha 1936.
- NEVSKÝ, B. A.: Příručka nomografie [A handbook of nomography]. — Praha 1951.
- PENKA, M.: Hodnocení půdní vody z biologického hlediska metodou vysychacích křivek [The estimation of soil water from the aspect of the biological method of drying curves]. — Čs. biologie (Praha) **5** : 105—116, 1956.
- SCHMID, W., HANDEL, A., SCHONE, W.: Graphisches Rechnen und Nomographie. — Freiberg 1957.
- SPURNÝ, M., DOSTÁLEK, M., ÚLEHLA, J.: Metoda kvantitativního stanovení desulfurikačních bakterií [A method for evaluating the sulphate-reducing bacteria]. — Čs. mikrobiologie (Praha) **1** : 272—281, 1956.
- SPURNÝ, M., DOSTÁLEK, M.: Stanovení původní mikroflory desulfurikačních bakterií ve vodách sirovodíkových pramenů [The use of submerged slide technique for evaluating the sulphate-reducing bacteria contaminants occurring in hydrogen sulphide waters]. — Preslia **29** : 125—131, 1957.
- SPURNÝ, M.: Výzkum fyzikálně chemických procesů při těžbě nafty a zemního plynu. II. Uvolňování nafty z kolektorových hornin jednofázovým tokem [Investigation of physico-chemical processes in exploitation of oil and of natural gas. II. The release of oil from petroleum-bearing rocks by single-phase flow]. — Práce Ústavu pro naftový výzkum, Brno 1959, in the press.

Address: Dr. Miloš Spurný, Laboratoř pro studium biologických dějů filmem. ČSAV brněnská základna. Bino, Ypsilantiho 2, Czechoslovakia.

BIOL. PLANT. **1** (4) : 266—276, 1959

Анализ экспериментальных данных при помощи графиков с объединенными шкалами

М. СПУРНЫ

Научно-исследовательский институт нефти

Поступило 20 марта 1959 г.

Резюме

При графическом изображении взаимоотношений трех или более зависимых переменных оправдало себя построение графиков с дополнительными сетями, координат, в которых некоторые признаки общие с номограммами.

Принцип предлагаемого графического анализа подробно рассматривается на конкретных примерах.

Автор предлагает пользоваться описанным графическим методом прежде всего в практике биологических исследований, так как большей частью в этой области приходится работать с эмпирически определенными отношениями, для которых трудно найти математическое выражение, приводящее к построению настоящей номограммы. Преимущество приведенного метода в том, что по полученному графику (номограмме) можно отсчитывать взаимоотношения всех исследуемых величин.

The Role Played by Growth in the Determination of Water Deficit in Plants

JIRÍ ČATSKÝ

Department of Plant Physiology, Institute of Biology, Czechoslovak Academy of Sciences, Praha

Received March 27, 1959

Souhrn

Předložená práce zjišťuje, za jakých okolností můžeme považovat hodnoty vodního deficitu listů nebo rostlin, stanovené STOCKEROVOU (1929) metodou, za skutečný aktuální vodní deficit. K pokusům bylo použito listů tabáku *Nicotiana Sanderae* hort. Ke stanovení aktuálního vodního deficitu je popsána rychlá metoda, používající terčůků, vyříznutých z listů. Syčení těchto terčůků probíhá ve vlhčené plotně z 5% agaru.

Bylo zjištěno, že příjem vody odříznutým listem nemusí mít svůj původ jen v momentálním neúplném nasycení listových pletiv vodou, nýbrž je u mladých listů určován z velké míry jejich dlouhivým růstem. Tento předpoklad je dokládán mj. tímto:

1. Mladé listy přijímají vodu po značně delší dobu než listy staré, takže u nich není prakticky nikdy dosaženo plného nasycení do konstantní váhy, jak toho vyžaduje STOCKEROVA metoda (grafy 3 a 4).

2. Na rozdíl od výsledků STOCKEROVY metody se vodní deficit mladých listů, stanovený nasycením terčůků z nich vyříznutých, neliší nijak podstatně od deficitu listů starších (graf 8).

3. Podle STOCKERA stanovený vodní deficit mladých listů rostlin, nasycených *in situ* (tedy s prakticky nulovým deficitem) je značně vyšší, než by odpovídalo tomuto jejich nasycení (graf 9).

Summary

The aim of this work was to establish under what conditions the water deficit values obtained by STOCKER's (1929) method can be considered to be those for actual water deficits. It was found that the water intake of detached leaves is not necessarily due only to incomplete saturation of the leaf tissues with water, but that in young leaves it is caused to a great extent by their

extension growth. Thus, water deficit in the sense of STOCKER's definition is not merely a simple physiological state of incomplete saturation of the tissues, but is expressed by the sum of the need for water to achieve the greatest possible saturation of the tissues and the need for water in the normal course of the extension growth of cells.

Introduction

Using STOCKER's method (1929; the greatest amount of water taken up by a cut leaf with its petiole in water, in the dark, in a saturated atmosphere, expressed as a percentage of the water content of a fully saturated leaf) a higher water deficit is usually obtained for young, apparently fully turgid leaves than for wilted mature leaves (e.g. ARVIDSSON 1951). The aim of the present work was to determine under what circumstances this value for the water deficit may be regarded as the actual water deficit of the experimental leaf or plant, and to distinguish the factors governing this value.

Literature on the survival of leaves during cultivation in water (see YARWOOD 1946) shows clearly that in a detached leaf (with its petiole in water) the normal vital processes continue for a relatively long period as in an attached leaf. In the present case the most interesting of these processes is, of course, extension growth in the dark, which in a detached leaf is evinced through water intake by the petiole in the same way as the resaturation of leaves with a temporary lack of water—water deficit. The total increase in water in detached leaves may amount to over 50% of the original weight (RIEHM 1904).

On the other hand, examination of the water deficit and water intake of detached leaves has shown that in the majority of plants young leaves exhibit a more rapid and extensive water intake than mature leaves (WETZEL 1924, KRAUSE 1935, RUTTER and SANDS 1958).

Although the above facts are well known, very little attention has been paid so far to the possibility that in some cases a "deficit" caused by the growth of the experimental leaves may be at least partially involved. WELTEN (1933) and MÜLLER-STOLL (1935) do include increase due to extension growth among the errors of Stocker's method, but they do not lay much stress on this. WEATHERLEY (1950) followed the saturation while floating on water of disks punched out of not fully turgid leaves. The saturation curve is very steep at first, after 5—10 hours it then passes into a gradually ascending linear phase. WEATHERLEY considers this phase to be "probably due to the growth of the disks". A similar saturation curve was obtained by YEMM and WILLIS (1954) for the saturation of whole leaves. These authors then read the real value of the water deficit by graphic extrapolation of the linear ascending part of the saturation curve.

Material and Methods

As experimental material 100- to 150-day-old *Nicotiana glauca* hort. (*N. Forgetiana* hort. ex HEMSLEY × *N. alata* LINK et OTTO) plants, which had been cultivated in the glasshouse at temperatures of 18—25°C, were used. The plants were at the stage of growth where the leaf rosettes consisted of 7—15 leaves. The water deficit was determined:

1. By STOCKER's original method, maintaining the conditions laid down by the author (1929);

2. By saturation of the leaves following the creation of a partial vacuum. This method is analogical to that of HAMNER et al. (1945). After weighing, the leaves with their petioles in water were placed in an exsiccator and air was pumped out to 450 mm. Hg. for five minutes. Air saturated with water vapour was then let into the exsiccator and the leaves were left in the dark for 3 hours. They were then weighed, dried and the water deficit was evaluated using STOCKER's method. No significant difference in results was found between this apparently more precise method and that of STOCKING (1948—partial vacuum applied only to the petioles);

3. By saturation of leaf disks: disks averaging 12.5 mm. (the rules for the taking of average samples being observed) were cut out of the experimental leaves with a sharp cork-borer. These were weighed and allowed to saturate for 2.5 hours at 25° C in the holes of a plate of 5% agar, which was covered on both sides by damp filter paper in a Petri dish and supplied with water during the experiment. (For preparation of the plate see BARTOŠ, KUBÍN and ŠETLÍK 1960).

The disks were then removed, slightly dried between filter papers and weighed. The further procedure and the evaluation were carried out as in STOCKER's method. Details of this method will be given for the different experiments.

Results

A. Water deficit using STOCKER's method and insertion of the leaves

The results given below provided information on the water deficit values using STOCKER's method and on the growth intensity of leaves up the genetic spiral.

Experiment 1.

Twenty-four plants, as similar to each other as possible, were selected; they were cultivated in the glasshouse and their water deficits were determined by STOCKER's method (48-hour period of saturation) at different degrees of saturation gradually in the course of 7 days. The purpose was to ascertain the relation of water deficit to the level of leaf insertion under different conditions of water supply. No significant differences in the curve of deficit and insertion for plants with different water deficits were found, but the absolute values of deficits were, of course, governed by the degree of saturation of the plants. Fig. 1 shows averages of all results, i. e. an ideal curve of the relation between STOCKER's deficit and level of leaf insertion.

Experiment 2.

The growth in length of the leaves of six plants over a period of 48 hours was measured (measurement of length between the tip and an ink mark at the leaf base). Results are shown in fig. 2. Similar results were obtained in two other experiments carried out in the same way.

B. The dynamics of saturation of young and old leaves

Published results and the present experiments 1 and 2 lead to the assumption that young, growing leaves will take in water as long as they are capable of extension growth; according to published results, for some days. The deficits of older leaves have to be compensated in a much shorter time. The correctness of this assumption was confirmed by experiments 3 and 4. Similar results were obtained in two further experiments.

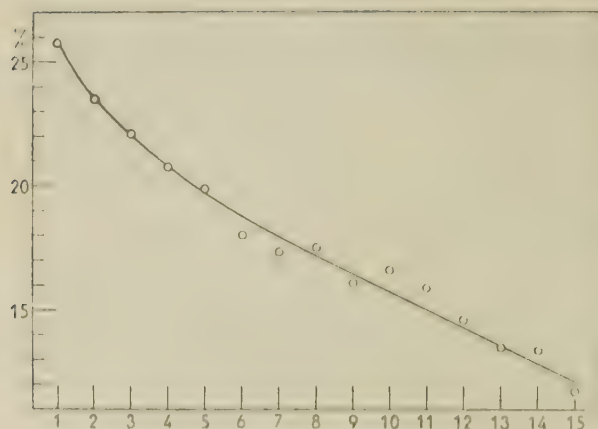
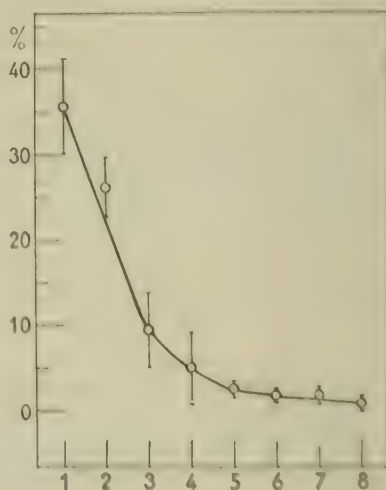


Fig. 1. Water deficit by STOCKER's method up the genetic spiral. Averages from 24 plants. x : order of leaves from the tip. Leaf 1. — area about 8 cm². y : percentage deficit.

Fig. 2. Intensity of growth in length up the genetic spiral. Averages from 6 plants $\pm$ s_x . x : order of leaves from the tip. Leaf 1. — area about 8 cm². y : increase in length of leaf in 48 hours in %.



Experiment 3.

Five plants were cultivated in the glasshouse for 24 hours before the start of the experiment at a relative air humidity of 80%. Detached leaves were then saturated by the normal Stocker method. They were quickly weighed at definite time intervals during the process of water intake. Any drops of water on the leaves were removed with filter paper. The results are given in fig. 3.

Experiment 4.

The plants were cultivated before the start of the experiment at a relative humidity of 50%, and were sparingly watered. Otherwise the procedure was the same as in experiment 3. Results are entered in fig. 4. Similar results were obtained in four repetitions.

C. Other methods of determining water deficit

In further experiments an attempt was made to work out a method for the determination of water deficit whereby the period required for the saturation of leaves would be shortened to the utmost so as to eliminate the influence of extension growth.

Experiment 5.

From each of five plants two neighbouring mature leaves were detached, of which in one (alternately the higher and lower on the genetic spiral) the dynamics of saturation were followed by Stocker's method and in the other by the method of HAMNER et al. (v. Methods). For the dynamics of saturation see experiment 3. Results are entered in fig. 5.

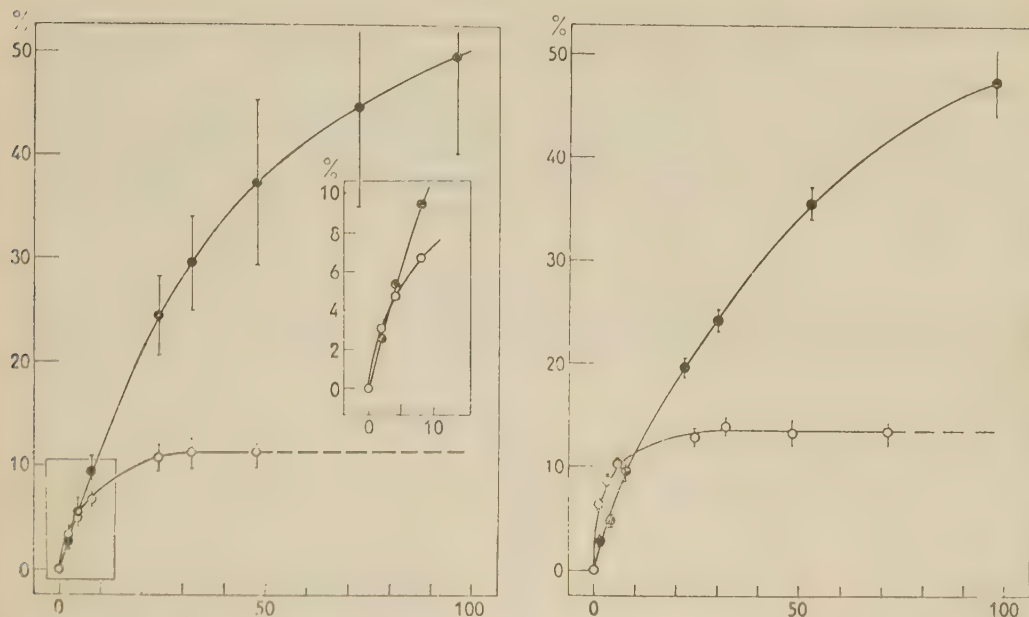


Fig. 3 and 4. Dynamics of saturation of young and old leaves. Averages from 5 plants $\pm$ s_x . (● — young, ○ — old). x : period of saturation in hours. y : increase in weight of water as percentage of original weight of water in the leaf.

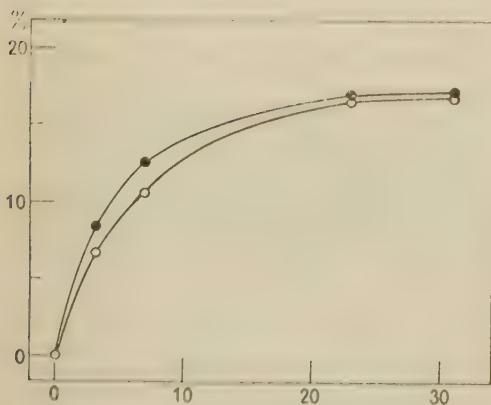


Fig. 5. Dynamics of leaf saturation by the methods of STOCKER (●) and HAMNER et al. (○). x : period of saturation in hours. y : increase in weight of water as percentage of original weight of water in the leaf.

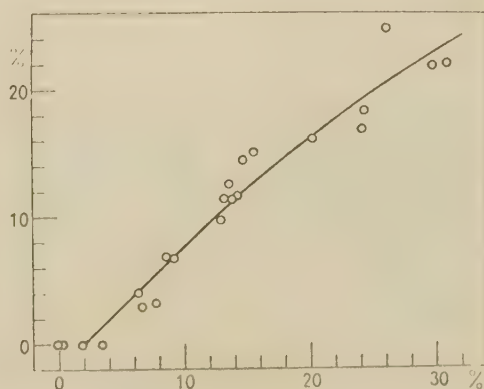


Fig. 6. Determination of water deficit by the "disk" method. x : deficit as determined by the disk method. y : actual deficit (see account of experiment).

Experiment 6.

Corresponding mature leaves were detached from 22 plants. They were put to saturate with their petioles in water for 48 hours in a water-saturated atmosphere in the dark. They were then weighed and left to wilt on a silon net at 20° C and 60% relative humidity for varying periods. After they had been weighed again (to determine the deficit) two disks were cut out of each (from the centre of the leaf along both sides of the main vein) and water deficit was measured by saturation of the disks in agar (see Methods). Results are given in fig. 6.

Experiment 7.

Disks were cut out of mature leaves at varying stages of wilting. These disks were weighed and placed on an agar plate. They were removed at stated intervals, carefully dried with filter paper and weighed. The dry weights and water content at the end of the experiment were entered in fig. 7.

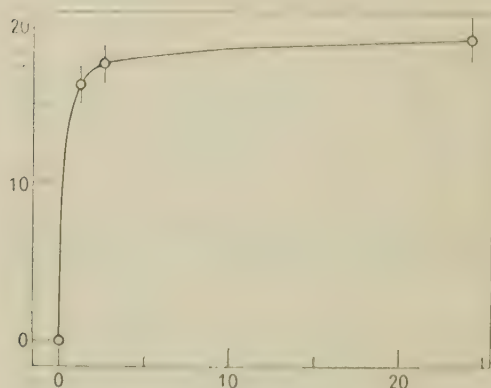


Fig. 7. Dynamics of saturation of leaf disks. *x*: period of saturation in hours. *y*: increase in weight of water as percentage of original weight of water in the disks.

D. Comparison of results obtained by STOCKER's and the "disk" methods

In the experiments described below the results of water deficit determinations by STOCKER's method and the "disk" method are compared on the assumption that the differences between the two sets of results correspond to the intensity of growth of the leaves. This difference is then compared with the "deficit" (according to STOCKER) of attached leaves on saturated plants, i.e. in the author's view with growth.

Experiment 8.

Two disks were cut out of each of the leaves of one plant (from the centre of the leaves along each side of the main vein) and water deficit was determined. The remaining parts of these leaves were used for determining water deficit by STOCKER's method. Results are given in fig. 8. Similar results were obtained in two further experiments.

Experiment 9.

Four plants were abundantly watered in the glasshouse (80% rel. humidity) 18 hours before the start of the experiment. The roots were then washed and the plants were placed for a further

22 hours with their roots in water in a saturated atmosphere. The water deficits of the leaves were then determined by the normal STOCKER method (48-hour period of saturation). Results are entered on fig. 9. Similar results were obtained in three repetitions.

Fig. 8. Comparison of deficit obtained by STOCKER's method (○) and that determined by the "disk" method (●), up the genetic spiral. x : order of leaves from the tip. Leaf 1. — area about 8 cm². y : percentage deficit.

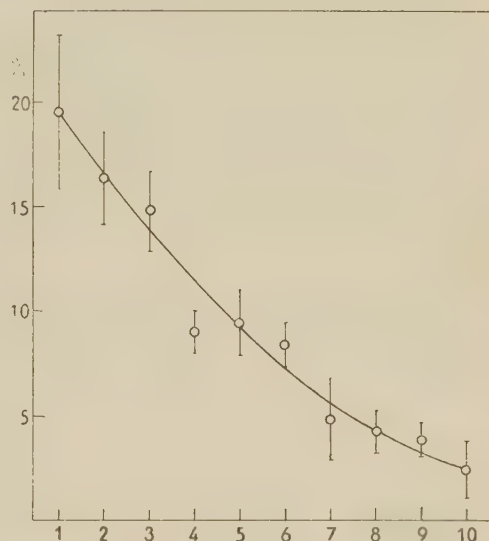
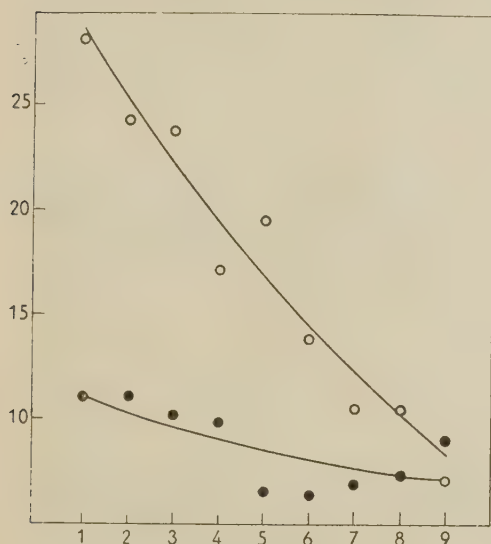


Fig. 9. Deficit of leaves on plants saturated *in situ* — STOCKER's method. Averages from 4 plants $\pm s_x$. x : order of leaves from the tip. Leaf 1. — area about 8 cm². y : percentage deficit.

Discussion

A comparison of the above results with already published data indicates clearly that some of the shortcomings of STOCKER's method which have been pointed out hitherto (e.g. wide range of values and lack of correspondence between results obtained at different times of the year — HÄRTEL 1936) can be explained on the basis of the present author's assumption that the "deficit" in young leaves is caused to a great extent by their extension growth in the course of the determination. From this point of view the actual comparison of results obtained at different stages of development, or at different times of the year, must be very difficult, because even when the other conditions are strictly constant it is very probable that a different deficit will be obtained for young, growing leaves than for adult leaves. This also corresponds to data given by WETZEL (1924) and KRAUSE (1935), who found, by immersing whole leaves in water, a more rapid water intake and greater possible saturation for spring leaves. The same applies to the possibility of determining the deficit for a plant as a whole on the basis of measurements carried out on some of its leaves. Since at least partially growing leaves form a high proportion of

all the leaves on some plants, it is also very difficult to obtain a reliable statement of the time necessary for the full saturation of leaves, as has been attempted by almost all the authors named. For the majority of leaves one, or at the most two days do in fact suffice for full saturation to be achieved (e.g. PÍSEK and CARTELLIERI 1931, MÜLLER-STOLL 1935, HÄRTEL 1936, RUTTER and SANDS 1958), sometimes just a few hours is enough (YEMM and WILLIS 1954), while for others several days are required (STOCKER 1929, ARVIDSSON 1951, FRITZ 1956). The view expressed by SCHANDLER (1930) and WELTEN (1933) that it is necessary to determine the period of saturation, experimentally for each experimental plant is the most realistic. Graphs 3 and 4 clearly indicate that one weighing of the leaves after a certain period is not sufficient for accurate work; it is quite obvious that the dynamics of saturation must, above all, be followed between the 48th and 72nd hours.

When determining the water deficits of leaves along the genetic spiral it was found by STOCKER's method that the deficit in young leaves is much higher than in adult leaves (Fig. 1; ARVIDSSON 1951). From already published work (e. g. TUMANOW 1927) and from the appearance of young and old leaves it seems probable, however, that young leaves do not suffer from lack of water to such an extent as is indicated by the values for their deficits obtained by STOCKER's method, while older leaves have a relatively high deficit. It is probable that the differences in initial intensity of water intake shown in fig. 3 and 4 are connected with this fact; WELTEN (1933) and KRAUSE (1935) state that leaves with an initially high deficit have a much more rapid intake when immersed in water than those with a low deficit. This can be explained by the intake curves being phases of logarithmic curves (OPPENHEIMER 1954, FRITZ 1956), the initial values of which are fixed by the initial values of the deficits. The saturation curves for young leaves are syntheses of curves of the intake of water to make up for actual deficit and curves of water intake for extension growth of cells.

In interpreting the results of experiments in groups C and D it is necessary to consider to what extent we can regard water deficit obtained either following the creation of low pressure (450 mm. Hg.), or by saturation of leaf disks, as a real water deficit, i. e. as incomplete saturation of the leaves at the given time. Both methods were used in order to shorten to the utmost possible extent the time necessary for the saturation of the leaves and thus reduce considerably the influence of growth. The author realises, however, that a strict distinction between real water deficit and the need of water for extension growth of the cells is in some respects rather ambitious. However, insufficient water supply to the leaf tissues, especially the temporary daily deficit in adult leaves, has in all cases a more harmful effect on the plant (inhibition of all vital processes) than a similarly high deficit in young leaves measured by STOCKER's method (TUMANOW 1927, STÄLFELT 1956). This also has a bearing on the well-known fact that insufficient soil humidity has as its initial result a very definite inhibition of growth.

The "vacuum" method was employed because uninjured leaves can be used. Fig. 5 shows, however, that the acceleration of saturation following the vacuum treatment is insufficient and cannot serve as a clear indicator of actual water deficit.

For this reason the "disk" method was later chosen, and it is considered that the results obtained are sufficiently accurate, although somewhat higher (fig. 6; OPPENHEIMER 1954). The range of values in fig. 6 is not only caused by inaccurate results, but also by actual differences in water deficit values in the area of the leaf blade (OPPENHEIMER 1954, SLAVÍK 1959), which of course are not completely eliminated even by the taking of average samples, and further by the very nature of STOCKER's method whereby the deficit of a whole leaf is measured, i. e. including the water-conducting tissues. Published results allow it to be assumed that the saturation of disks takes place very quickly in view of their small area and that it is practically finished within 3 hours (WEATHERLEY 1947, 1950, OPPENHEIMER 1954). Using the procedure described in this paper (see Methods) complete saturation was achieved much

sooner, especially when deficits were low (fig. 7). This means that the influence of growth is reduced to a low level and the results can be considered to correspond to the values for water deficit at the given time. This assumption is supported by the fact that differences between deficits obtained by the above method and STOCKER's method, i. e. according to the author's conception the growth (fig. 8), corresponds very exactly to the results of experiments in which growth alone was measured by STOCKER's method (fig. 9) on plants saturated *in situ* (i. e. with practically zero water deficit). Low deficits in older plants, in which growth is already very insignificant, are those which are often referred to as "originating" after the detachment of leaves from the plant; they are caused by an increase in the water saturation capacity following the removal of all forces acting in opposition to the water intake by leaves on the plant.

Acknowledgment:

The author wishes to express his sincere thanks to Dr. B. Slavík for his valuable advice and interest in this work and for his kindness in reading the manuscript. Sincere thanks are also due to Mrs. M. Krejcarová for her technical help in connection with some of the experiments.

References

- ARVIDSSON, I.: Austrocknungs- und Dürresistenzverhältnisse einiger Repräsentanten ölandischer Pflanzenvereine nebst Bemerkungen über Wasserabsorption durch oberirdische Organe. — *Oikos*, suppl. **1** : 1—181, 1951.
- BARTOŠ, J., KUBÍN, Š., ŠETLÍK, I.: Dry weight increase of leaf disks as a measure of photosynthesis. — Manuscript prepared for *Biol. Plant.* **2**, 1960.
- FRITZ, M.: Über die Aufsättigung abgeschnittener Blätter bei Einstellen in Lösungen von Elektrolyten und Anelektrolyten. — *Protoplasma* **46** : 198—209, 1956.
- HAMNER, C. L., CARLSON, R. F., TUKEY, H. B.: Improvement in keeping quality of succulent plants and cut flowers by treatment under water in partial vacuum. — *Science N. S.* **102** : 332—333, 1945.
- HÄRTEL, O.: Pflanzenökologische Untersuchungen an einem xerothermen Standort bei Wien. — *Jb. wiss. Bot.* **83** : 1—59, 1936.
- KRAUSE, H.: Beiträge zur Kenntnis der Wasseraufnahme durch oberirdische Pflanzenorgane. — *Österreich. bot. Ztschr.* **84** : 241—270, 1935.
- MÜLLER-STOLL, W. R.: Ökologische Untersuchungen an Xerothermpflanzen des Kraichgaus. — *Ztschr. Bot.* **29** : 161—253, 1935.
- OPPENHEIMER, H. R.: Critique experimentale de deux méthodes employées en vue d'établir le déficit de saturation hydrique (DSH) des feuilles. — *Rap. et Comm. 8ème Congr. int. Bot. (Paris)*, sec. **11—12** : 218—220, 1954.
- PISEK, A., CARTELLIERI, E.: Zur Kenntnis des Wasserhaushaltes der Pflanzen. I. Sonnenpflanzen. — *Jb. wiss. Bot.* **75** : 195—251, 1931.
- RIEHM, E.: Beobachtungen an isolierten Blättern. — *Diss., Univ. Halle*, 1904. Cit. YARWOOD 1946.
- RUTTER, A. J., SANDS, K.: The relation of leaf water deficit to soil moisture tension in *Pinus sylvestris* L. I. The effect of soil moisture on diurnal changes in water balance. — *New Phytol.* **57** : 50—65, 1958.
- SCHANDERL, H.: Ökologische und physiologische Untersuchungen an der Wellen- und Muschelkalkflora des Maintales zwischen Würzburg und Gambach. — *Planta* **10** : 756—810, 1930.
- SLAVÍK, B.: Water relations within the area of one leaf blade. — *Proc. 9th int. bot. Congr. (Montreal)* vol. **2** : 367, 1959.
- STÄLFELT, M. G.: Morphologie und Anatomie des Blattes als Transpirationsorgan. — *Hdb. der Pflanzenphysiologie*, Bd. 3, S. 324—341, i. e. 329; Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1956.

- STOCKER, O.: Das Wasserdefizit von Gefäßpflanzen in verschiedenen Klimazonen. — *Planta* **7** : 382—387, 1929.
- STOCKING, C. R.: Recovery of turgor by cut shoots after wilting. — *Plant Physiol.* **23** : 152—155, 1948.
- TUMANOW, J. J.: Ungenügende Wasserversorgung und das Welken der Pflanzen als Mittel zur Erhöhung ihrer Dürre-resistenz. — *Planta* **3** : 391—480, 1927.
- WEATHERLEY, P. E.: Note on the diurnal fluctuations in water content of floating leaf disks. — *New Phytol.* **46** : 276—278, 1947.
- WEATHERLEY, P. E.: Studies in the water relations of the cotton plant. I. The field measurement of water deficits in leaves. — *New Phytol.* **49** : 81—97, 1950. — II. Diurnal and seasonal variations in relative turgidity and environmental factors. — *New Phytol.* **50** : 36—51, 1951.
- WELTEN, M.: Physiologisch-ökologische Untersuchungen über den Wasserhaushalt der Pflanzen mit besonderer Berücksichtigung der Wasserabgabewiderstände. — *Planta* **20** : 45—165, 1933.
- WETZEL, K.: Die Wasseraufnahme der höheren Pflanzen gemässiger Klimate durch oberirdische Organe. — *Flora* **117** : 221—269, 1924.
- YARWOOD, C. E.: Detached leaf culture. — *Bot. Rev.* **12** : 1—56, 1946.
- YEMM, E. W. and WILLIS, A. J.: Stomatal movements and changes of carbohydrate in leaves of *Chrysanthemum maximum*. — *New Phytol.* **53** : 373—396, 1954.

Address: Jiří Čatský, Prom. Biol., Biologický ústav ČSAV, Praha 6 - Dejvice, Na evičišti 2.

BIOL. PLANT. **1** (4) : 277—286, 1959

Роль роста при определении водного дефицита растений

ИРЖИ ЧАТСКИЙ

Отдел физиологии растений Биологического института
Чехословацкой Академии Наук, Прага

Поступило 27 марта 1959 г.

Резюме

Предлагаемая работа устанавливает, при каких обстоятельствах данные по водному дефициту листьев или целых растений, определенные по методу Стоккера-а, можно считать настоящим актуальным водным дефицитом. Опыты проводились на листьях табака *Nicotiana Sanderae* hort. Описывается быстрый метод определения водного дефицита: из листьев вырезаются диски, которые насыщаются водой на увлажненных пластинках из 5% агар-агара.

Было установлено, что потребление воды отрезанным листом не обязательно обуславливается неполным насыщением тканей листа водой в данный момент, определяясь в большей мере у молодых листьев их ростом в длину. В пользу этого предположения можно привести следующие факты:

1. Молодые листья принимают воду значительно дольше, чем взрослые, так что у них практически никогда не достигается полного насыщения до постоянного веса, как этого требует метод Стоккера-а (график 3 и 4).

2. В отличие от результатов, полученных по методу Стоккера-а, водный дефицит молодых листьев, определенный путем насыщения дисков вырезанных из этих листьев, в основном не отличается от дефицита более старых листьев (график 8).

3. Водный дефицит молодых растений, насыщенных *in situ* (т. е. практически с нулевым дефицитом), определенный по методу Стоккера-а, оказывается гораздо более высоким, чем это соответствовало бы их насыщению (график 9).

A Method of Storage of Leaf Samples for Chlorophyll Analysis

ZDENĚK ŠESTÁK

Department of Plant Physiology, Institute of Biology, Czechoslovak Academy of Sciences, Praha

Received April 3, 1959

Souhrn

Byla vyzkoušena metoda, kterou lze uchovávat vzorky listů po 1 až 3 měsíce, aniž poklesne množství chlorofylu ($a + b$) o více než 5 % respektive o 10 %:

Kotoučky o průměru 8 mm, vyříznuté z listů, se po 10 až 15 dají do zkumavek velikosti 10 až 12 × 85 až 110 mm. Přidá se špetka $MgCO_3$ a 2 ml bezvodého předestilovaného acetonu. Zkumavka se asi do poloviny ponoří do vody teplé cca +80° C. Jakmile se aceton začne vařit, zkumavka se rychle uzavře zátkou prosycenou teplým parafinem a ochladí se ponořením do studené vody. Zkumavky se skladují ve tmě při teplotách okolo 0° C.

Probíhající změny v obsahu barviv nesníží výsledky kolorimetrického stanovení, pokud nejde o kyselé pletiva (begonie, červené odrůdy krmné kapusty). Metoda je rychlá, provozní a lepší než ostatní zkoušené jednoduché postupy. Osvědčila se pro tykev, slunečnici, krmnou kapustu (některé odrůdy), cukrovku, jetel a tabák. Lze ji užít s výhodou pro analýsu chlorofylu při zemědělských pokusech většího rozsahu.

Summary

In the course of experiments with leaf samples of pumpkin, sunflower, leafy fodder kale, sugar beet, tobacco, clover and begonia several methods of storing material were compared with the object of determining the amount of chlorophyll ($a + b$) after 1 to 3 months. Chlorophyll analyses checked by paper chromatography provided evidence that the most reliable method of serial analyses is the following: Leaf discs are heated in very pure anhydrous acetone to its boiling point (with some $MgCO_3$ present), rapidly closed with a paraffin stopper and then kept in the dark at temperatures just above 0° C. 50 leaf samples can thus be prepared for storage within 30 minutes. The

decrease in total chlorophyll ($a + b$) content after 28 days of storage does not exceed 5%, after 84 days of storage 10% of the initial value. Chemical conversions of chlorophyll take place here which do not appreciably affect the spectrum of the acetone extract. The method cannot be applied to plants with acid-reacting cell juice (begonia, red varieties of fodder kale and the like). Other practicable methods of storage (a different storage in acetone, storage of fresh samples at $+2$ to $+3^\circ\text{C}$, drying at $+50^\circ\text{C}$, storage at laboratory temperature) bring about more serious destruction of the pigments.

Introduction

When extensive experiments are carried out, especially during the vegetation season, it is often convenient to postpone chlorophyll analyses to a later time. For this reason numerous experiments were carried out with leaf sample storage with the aim of ensuring minimal changes in labile leaf pigments.

WILLSTÄTTER and STOLL (1913) recommend the drying of the "more resistant" leaves (*Urtica*, *Galeopsis*) at a slightly increased temperature (above a stove), the "less resistant" ones (*Sambucus*, conifers) in a vacuum exsiccator over sulphuric acid. HARRIMAN (1930) gives a more exact temperature for soya and *Nasturtium* drying $+45^\circ$ ($+30^\circ$) to $+60^\circ\text{C}$; exsiccation over sulphuric acid is suitable for four days at 70 mm. Hg. Temperatures between 0° and $+30^\circ\text{C}$ are not recommendable as a number of enzymes has a destructive effect in that range. This was confirmed by SCOTT and KRAMER (1949) who did not find significant differences between 0° and $+20^\circ\text{C}$ for asparagus storage; at all the temperatures tested chlorophyll was severely destroyed in relation to time from 0 to 7 days. However, two-day storage of grasses at room temperature did not affect the chlorophyll content (HARBERTS et al. 1955). According to DELEANO and DICK (1938) leaves of *Salix fragilis* L. are more conveniently dried in the shade than in the light where 43% of the initial chlorophyll content is decomposed within 120 hours at $+34$ to $+38^\circ\text{C}$. For drying times of 6 hours, 3.4% is decomposed at $+40^\circ\text{C}$, 76.6% at $+65^\circ\text{C}$ and practically the entire amount above $+80^\circ\text{C}$. Thus the authors disagree about the optimal temperature for drying: in addition to $+45$ to 50°C (COSGROVE and GUTH 1954; MARY et al. 1954) also $+70$ to $+80^\circ\text{C}$ is given (GENEST 1955, for spinach).

Of sub-zero temperatures only those at which the sample freezes thoroughly, i. e. -10° to -40°C are reported to be of importance (GUTHRIE 1929; HARRIMAN 1930). GUTHRIE succeeded in keeping sunflower and potato leaves for 7 to 28 months. Losses were not proportional to time and amounted to 0–12%. This method is often used (McNULTY and NEWMAN 1956 stored fruit-tree leaves for 3 weeks at -17.8 to -12.2°C ; WAGENKNECHT et al. 1952 stored green peas at -18 to -23°C , etc.).

Blanching (submersion in boiling water for 1 min. to inactivate enzymes prior to storage) is occasionally recommended (WAGENKNECHT et al. 1952a, 1952b, for frozen peas) but also rejected (DUTTON et al. 1943, for dehydrated spinach). It depends on the type of storage and on the water content of

samples. According to STRAIN (1954) blanching like drying at 20° C brings about the formation of chlorophyll isomers (a' , b').

In experiments with medicinal plant leaves (MARY et al. 1954; COSGROVE and GUTH 1954) freeze-drying was found more convenient than drying at +45 to +50° C for 36 hours. The dried samples contained 7 to 25.5% less chlorophyll.

ZSCHEILE et al. (1944) recommend the freezing of maize leaves and keeping them at -20° C for a month. If storage for more than 7 months is desired, then fresh leaves should be kept in acetone. Vacuum drying at +40° C is not suitable.

The aim of this paper was to test a method which would suit field experimenters; which would be easy from the point of view of time and equipment (i. e. without freeze-drying and deep-freeze temperatures). Conservation and storage should not diminish the total chlorophyll ($a + b$) content, as measured by common colorimetry, by more than 10%.

Material and Methods

Plants. Fully developed or ageing leaves of pumpkin of unknown origin, sunflower (firstly, newly selected strain No. 147 Sládkovičovo; secondly, of unknown origin), leafy fodder kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*, Markstammkohl and Coulet de Flandre varieties), sugar beet Dobrovická A var.), tobacco (population of *Nicotiana tabacum* L.), clover (selected types from populations of *Trifolium pratense* L.) and begonia (*Begonia rex* PUTZEYS) were used.

Sampling. In order to save space it is not always necessary to store all the material; it suffices to remove a representative sample with a cork-borer (a definite number of discs) which can be compared with the whole leaf in several analyses. If the quantity of chlorophyll in the entire leaf area is calculated from the area of the removed discs a certain error is introduced because the area of leaf nervature is included which contains very little chlorophyll.

In the described experiments one sample contained always 12 discs of 8 mm. in diameter (0.5 cm.²), i. e. a total of 6 cm.² leaf area. Since 64 samples of the same chlorophyll content were always required for the purpose of comparison, they were removed as follows: from each species (with the exception of clover) 12 leaves of approximately the same size were always removed. Each sample contained discs from all parts of the leaf (from base to apex) but each disc originated from a different leaf. Thus in Fig. 1, sample No. 1 was composed from a disc from position 1 of the first leaf, a disc from position 2 of the second leaf etc. until the last disc came from position 12 of the twelfth leaf. Sample No. 2 contained a disc from position 2 of the first leaf, a disc from position 3 of the second leaf etc. until the last disc was taken from position 1 on the twelfth leaf, and so on. This procedure ensured a sufficient homogeneity of all samples (coefficient of variation for sunflower was 2.08, for tobacco 1.59, for sugar beet 5.07 etc.).

Storage methods. A. Discs in test-tubes (10 × 110 mm. or 10—12 × 85 mm.) were covered with 2 ml. anhydrous acetone (pure, redistilled), some MgCO₃ added and stoppered with a cork stopper.

B. The same as (A) but prior to stoppering the test-tube was submerged (above half of its length) in water at +80° C. When acetone began to boil (b. p. +56.5° C) the test-tube was

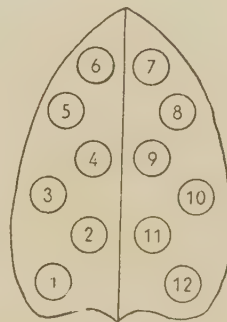


Fig. 1. Diagram of removal of leaf samples (description on p. 289).

quickly closed with a stopper saturated with warm paraffin, removed from the water bath and cooled by submersion in cold water.

C. Discs in open test-tubes were dried for 36 hours at $+50^{\circ}\text{C}$ in a thermostat.

D. Fresh discs in test-tubes were closed with paraffin-saturated stoppers.

Samples were stored in closed boxes at room temperature or in a cold-chamber at c. $+2$ to $+3^{\circ}\text{C}$.

Determination of chlorophyll (a + b) content. The discs were ground with a small amount of silica sand, extracted with anhydrous and 85% acetone. The extract was filtered through a G 4 glass sinter and the volume made up to 20 ml. with acetone. The extinction of acetone extracts was measured in 1 cm. cuvettes on a PULFRICH photometer using a S 64 filter. Chlorophyll content was computed from the extinction values with the aid of a calibration curve for a 3 : 1 mixture of chlorophyll *a* and *b*. For calibration crystalline chlorophyll was used obtained from Dr. E. WIEDEMANN, of the Sandoz Co., Basel, Switzerland.

Control of pigment decomposition. Checking was carried out by paper chromatography (cf. ŠESTÁK 1958). Samples on Whatmann paper 1 or 3 were developed unidimensionally in the ascending direction. Size of paper 270×135 mm. Extract used was in acetone or ether. Solvent system employed was either toluene or a mixture of benzin-benzene-chloroform-acetone-isopropanol (50 : 35 : 10 : 0.5 : 0.17) described by HAGER (1955) or a mixture of toluene and methanol (400:1), which is a modified system of CHIBA and NOGUCHI (1954). Time of development was about 60 min. Carotenoid spots were marked with pencil immediately after development (they are oxidized rapidly and disappear), chlorophylls and their derivatives were observed under ultra-violet light.

Results

Changes in chlorophyll (a + b) content

Sixty-four uniform samples of a total area of 6 cm.² were removed from leaves of sugar beet, sunflower, tobacco and begonia. In 16 samples chlorophyll was determined immediately; in 8 of these directly (control), in 8 after heating with acetone and MgCO_3 . Sets of 8 samples were preserved by using the methods (A), (B) and (C) and kept in the laboratory, sets of 8 samples were preserved by using the methods (A), (B) and (D) and kept in a cold-room at c. $+2$ to $+3^{\circ}\text{C}$. From these sets one half (4 samples from each) was removed after 4 weeks, the other half after 12 weeks of storage, and the chlorophyll content was determined. Analytical results are summarized in Table 1. The Table shows the chlorophyll content of the control (statistically

Table 1. The decrease in the content of chlorophyll (a + b) during different types and periods deviation from the mean of four samples as compared

Plant	K Control in μg . chlorophyll (a + b) ($\bar{x} \pm 3s_{\bar{x}}$)	K_1 Determined immediately after heating with acetone	A			
			Laboratory		Cold-room	
			28 d.	84 d.	28 d.	84d.
Sugar beet	$335.6 \pm 3.6.03$	— 0.5	— 26.8	— 46	— 6	— 29
Sunflower (unknown origin)	$535.6 \pm 3.4.06$	0	— 24.2	— 29	— 13	— 16.7
Tobacco	$281.2 \pm 3.1.58$	— 3.5	— 23.2	— 29.5	— 2.5	— 12.5
Begonia	$182.0 \pm 3.7.35$	— 30.8	— 31.8	— 29.1	— 33.5	— 22

treated) and differences from the control mean value of individual experimental sets. Results varied within the range of experimental error and the differences only rarely exceeded $\pm 5\%$; therefore their statistical treatment is not presented.

It follows from Table 1 that the best results are obtained with the (B) method of storage and samples kept in the cold (with the exception of begonia acid tissue). Therefore the method was tested on other material. Three samples formed an experimental set. Table 2 shows average values as percentages of initial value (pumpkin $347 \pm 3 \times 3.7 \mu\text{g. chlorophyll } (a + b)$, sunflower $333 \pm 3 \times 5.3 \mu\text{g.}$, fodder kale var. Markstammkohl $412 \pm 3 \times 6.2 \mu\text{g.}$).

Table 2. Values of chlorophyll ($a + b$) content during storage by method (B) (described on p. 289) in a cold-room. Expressed as % of control, analyzed immediately after removal of samples

Plant	Immediately	After 56 days	After 84 days
Pumpkin	100	96.5	95.5
Sunflower (strain 147 Sládkovičovo)	100	95	95.5
Fodder kale (var. Markstammkohl)	100	92.3	94.5

The same method was applied to storage of clover samples where discs from opposite leaf halves were compared. After 42 days of storage the amount of chlorophyll ($a + b$) decreased by 5.2% (average of 26 samples), after 77 days by 10% (average of 24 samples).

The method is not suitable for the storage of red varieties of fodder kale (var. Coulet de Flandre) whose red-violet colouring on the reverse side of leaves, due to anthocyanins, indicates an acid character of the vacuoles. After 105 days of storage the values oscillated very considerably and the decrease in chlorophyll content lay between 7.7% and 40.2% of the initial value (based on an analysis of 48 samples).

Chromatographic control of pigment conservation

The following conclusions can be derived on the basis of comparison of 41 paper chromatograms:

of storage. A, B, C, D-types of storage (described on p. 289). For K_1 , A, B, C, and D only the with the control is given (as % of initial value)

B				C		D	
Laboratory		Cold-room		Laboratory		Cold-room	
28 d.	84 d.	28 d.	84 d.	28 d.	84 d.	28 d.	84 d.
— 10.5	— 31	+ 1.5	— 10.2	— 34.6	— 46.3	— 7.5	— 20
— 13.9	— 25.5	— 3	— 7.3	— 27	— 25.5	— 5	— 11.3
— 15.7	— 28.4	— 2.5	— 7	— 47	— 48	— 9.6	— 9.2
— 35.2	— 31.3	— 31.2	— 22	— 36.3	— 30.7	+ 23.5	+ 16

1. In all methods of storage chlorophyllides are formed, which have practically the same spectrum as the chlorophylls (HOLT and JACOBS 1954) and do not affect the determination of chlorophyll in acetone solution. They are formed mostly on storage in acetone, particularly by the method (B).

2. In samples in acetone (A, B) there are more spots of products arising from chlorophyll *a* on standing in the solvent (cf. ANGAPINDU et al. 1958), visible particularly by developing in HAGER'S (1955) solvent mixture. Chlorophyll spots in samples stored by the method (D) are uniform.

3. During all the types of storage some phaeophytins are formed, which sometimes (sunflower, tobacco) separate into two spots of phaeophytin *a* and *b*. In clover and sugar beet not even a three-month storage by the method (A) and (B) gave rise to any detectable amount of phaeophytin. Drying of samples brings about a marked formation of phaeophytins, particularly from chlorophyll *a*. The decrease in chlorophyll content on drying is least marked with sugar beet.

4. Methods (A) and particularly (B) preserve the carotenoids well (1 spot of carotene and 2—3 spots of xanthophylls). Methods (C) and (D) bring about a frequent decrease in the amount of carotenoids, particularly of xanthophylls with more oxygen atoms in the molecule.

5. In red fodder kale (var. Coulet de Flandre) and particularly in begonia, a high amount of phaeophytins could be detected, which increases sharply on heating in acetone [method (B)] until chlorophylls disappear completely. Similarly carotenoids are broken down.

6. Results of the chromatographic study are in complete agreement with the values obtained by colorimetry and they confirm the advantages of the method (B) and of storage in cold.

Discussion

A review of literature alone displays a high variability of results. In addition to the various types of chlorophyll determination it is also very likely caused by the difference in material. Thus very acid leaves (begonia, red fodder kale of the Coulet de Flandre variety) must be excluded from storage. The pH of begonia cell juice is reported to be 1.3—1.6 (DRAWERT 1955, Table 5), as contrasted with the pH of 5.6—7.5 as given by various authors for clover, tobacco, sunflower and pumpkin. The exact relationship between the pH of the cell juice and the destruction of chlorophyll on storage cannot be derived as the leaf pH changes in the course of ontogenesis according to the above author and at the same time the stability of the chlorophyll-protein bond decreases (OSIPOVA 1947; MASLOVA 1958) thus rendering chlorophyll more vulnerable. The effect of the acid cell juice depends very probably on cell properties, particularly on permeability and on cell structure changes due to acetone, drying etc. These assumptions are in full agreement with the irregular decrease in chlorophyll content during storage of red fodder kale as well as with the process of pigment destruction in begonia. Phaeophytinization can also be observed during grinding and extraction of fresh begonia samples and not even very high amounts of $MgCO_3$ can prevent it. The unexpected increase in chlorophyll content in the method (D) (fresh discs of begonia kept in a test-tube in the cold) can be explained by a decrease in acidity of cells by resorption of acids, their loss due to respiration etc. The problem of extraction and storage of acid plant tissues is more complex and requires a detailed independent study. However, these extremely acid types occur only rarely among the commonly analyzed plants.

Shortcomings of the drying method consist not only in the formation of phaeophytin but also in the low extractability of chlorophyll from dried ground material. It is probable that irreversible changes in chloroplast structure took place, even at temperatures recommended by HARRIMAN (1930).

In agreement with the authors cited above in the introduction, room temperature has an unfavourable effect in the described experiments, as it varies considerably (from $+10^\circ$ to $+25^\circ$ C), even during storage in acetone. However, conservation at temperatures just above 0° C proved to be suitable even for fresh material [method (D)]. Enzymatic activity is apparently very much restricted and the decomposition of pigments by heat is prevented.

It follows from the results shown in Table 1 and 2 that the best method is (B) with storage in cold. After 3 months less than 10% chlorophyll was broken down and after 1 month less

than 5%, which is permissible in serial analyses working with an error of $\pm 5\%$. Heating in acetone (boiling at $+56.5^\circ\text{C}$) inhibits enzymatic activity and acetone penetrates well into the tissues. Acetone vapour displaces most of the air from above the sample and from the acetone itself; air oxygen could effect oxidation changes of the pigments. Acetone, recommended already by ZSCHEILE et al. (1944), does not bring about an allomerization of the chlorophylls which changes their spectral properties (in contrast to alcohol). The formation of chlorophyllides (STRAIN 1954) is of no consequence in the given case. Contact with the surrounding atmosphere and evaporation of the solvent are prevented by the paraffin stopper. Paraffin prevents furthermore the pigments from soaking into the cork stopper. Acids liberated from the vacuoles are partly neutralized by MgCO_3 . Conservation in dark and in cold diminishes the possibility of other destructive processes.

According to Table 1 only the procedure (D) approximates to this method but the decrease in chlorophyll content is somewhat higher, particularly after 28 days of storage; carotenoids are also decomposed.

For serial determinations the method (B) appears to be most suitable because the samples can be preserved with very primitive equipment even under field conditions and transferred to the low-output refrigerator only on the following day. The procedure is rapid—one worker can prepare 50 samples for storage within 30 minutes (not counting the removal of discs from leaves).

Acknowledgement:

I am indebted to my friends, especially to Dr. I. Šetlík and Dr. B. Slavík, for stimulating and valuable comments. My thanks are due to Dr. E. Wiedemann from Basel for kindly supplying me with samples of pure chlorophylls.

References

- ANGAPINDU, A., SILBERMAN, H., TANTIVATANA, P., KAPLAN, I. R.: The separation of chlorophylls by paper and cellulose column chromatography. — *Arch. Biochem. Biophys.* **75** : 56—68, 1958.
- CHIBA, Y., NOGUCHI, I.: A new method of paper chromatography of chlorophylls. — *Cytologia* **19** : 41—44, 1954.
- COSGROVE, F. P., GUTH, E. P.: Carbohydrate and chlorophyll content of leaves of *Digitalis purpurea* L. and *Digitalis lutea* L. after freeze-drying and oven-drying. — *J. amer. pharm. Ass. (sci. Ed.)* **43** : 268—269, 1954.
- DELEANO, N. T., DICK, J.: Über den Chlorophyllverlust trockender Laubblätter und über Chlorophyllextraktion. — *Biochem. Z.* **300** : 37—41, 1938.
- DRAWERT, H.: Der pH-Wert des Zellsaftes. — In: *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Bd. I. Pp. 627—648. Springer, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1955.
- DUTTON, H. J., BAILEY, G. F., KOHAKI, E.: Dehydrated spinach. Changes in color and pigments during processing and storage. — *Ind. Engng Chem.* **35** : 1173—1177, 1943.
- GENEST, C.: Verhalten des Chlorophylls im Spirat bei der Kammer- und Zerstäubungstrocknung. — *Dtsch. Lebensmittel-Rdsch.* **51** : 200—203, 1955.
- GUTHRIE, J. D.: Effect of environmental conditions on the chloroplast pigments. — *Amer. J. Bot.* **16** : 716—746, 1929.
- HAGER, A.: Chloroplasten-Farbstoffe, ihre papierchromatographische Trennung und ihre Veränderungen durch Aussenfaktoren. — *Z. Naturforsch.* **10b** : 310—312, 1955.
- HARBERS, C. L., IMMINK, H. J., DEIJIS, W. B.: Het chlorophylgehalte van gras in de loop van het weide-seizoen. — *Verslag C. I. L. O. over 1954* : 228—230, 1955.
- HARRIMAN, P. A.: Effect of various methods of storage on chlorophyll content of leaves. — *Plant Physiol.* **5** : 599—606, 1930.
- HOLT, A. S., JACOBS, E. E.: Spectroscopy of plant pigments. I. Ethyl chlorophyllides A and B and their pheophorbides. — *Amer. J. Bot.* **41** : 710—717, 1954.
- MARY, N. Y., CHRISTENSEN, B. V., BEAL, J. L.: The effect of freeze drying on chlorophyll in the leaves of some selected drug plants. — *J. amer. pharm. Ass. (sci. Ed.)* **43** : 554—557, 1954.

- MASLOVA, T. G.: K voprosu o sostoyanii khlorofilla v plastidakh zelenykh rasteny. [Concerning the problem of chlorophyll composition in green-plant plastids.] *Bot. Zh. AN SSSR* **43**: 103—106, 1958.
- McNULTY, I. B., NEWMAN, D. W.: The effects of a lime spray on the respiration rate and chlorophyll content of leaves exposed to atmospheric fluorides. — *Utah Acad. Proc.* **33**: 73—79, 1956.
- OSIPOVA, O.: Ob izvlekaemosti khlorofilla iz zelenykh rasteny. [Extractability of chlorophyll from green plants.] *Dokl. AN SSSR* **57**: 799—801, 1947.
- SCOTT, L. E., KRAMER, A.: Physiological changes in Asparagus after harvest. — *Amer. Soc. hort. Sci. Proc.* **54**: 357—366, 1949.
- ŠESTÁK, Z.: Paper chromatography of chloroplast pigments. — *J. of Chromatography* **1**: 293—308, 1958; *Chromatographic Reviews* **1**: 193—208, 1959.
- STRAIN, H. H.: Oxidation and isomerization reactions of the chlorophylls in killed leaves. — *Agric. Food Chem.* **2**: 1222—1226, 1954.
- WAGENKNECHT, A. C.: Deterioration in quality of frozen raw peas during storage. — *Quick Frozen Foods* **14**: 49—51, 1952.
- WAGENKNECHT, A. C., LEE, F. A., BOYLE, F. P.: The loss of chlorophyll in green peas during frozen storage and analysis. — *Food Res.* **17**: 343—350, 1952.
- WILLSTÄTTER, R., STOLL, A.: Untersuchungen über Chlorophyll. Pp. 53—56. J. Springer, Wien, 1913.
- ZSCHEILE, F. P., COMAR, C. L., HARRIS, D. G.: Spectroscopic stability of chlorophylls a and b and certain analytical considerations. — *Plant Physiol.* **19**: 627—637, 1944.

Address: Zdeněk Šesták, Prom. Biol., Biologický ústav ČSAV, Praha-Dejvice, Na cvičišti 2.

BIOL. PLANT. **1** (4) : 287—294, 1959

Метод хранения листьев для анализа хлорофилла

ЗДЕНЕК ШЕСТАК

Отдел физиологии растений, Биологический институт Чехословацкой Академии Наук.
Прага

Поступило 3 апреля 1959 г.

Резюме

Был испытан метод, при помощи которого можно сохранить образцы листьев в течение 1—3 месяцев, без снижения количества хлорофилла (a + b) больше чем на 5—10%.

Диски диаметром в 8 мм, вырезанные из листьев по 10—15 штук помещались в пробирки, размером 10—12 × 85—110 мм. Прибавлялось немного $MgCO_3$ и 2 мл безводного дистиллированного ацетона. Пробирка погружается в воду, нагретую примерно до 80 °C. Как только ацетон начнет кипеть, пробирка быстро затыкается пробкой, насыщенной теплым парафином, и охлаждается погружением в холодную воду. Пробирки хранятся в темноте при температуре около 0 °C.

Происходящие изменения в составе пигментов не снижают данные колориметрических измерений, за исключением кислых тканей (бегония, красные сорта кормовой капусты). Этот метод быстрее и лучше, чем остальные испытанные простые приемы. Он оказался очень удобным для работы с тыквой, подсолнечником, кормовой капустой (некоторые сорта), сахарной свеклой, клевером и табаком. Его можно успешно использовать для анализа хлорофилла при сельскохозяйственных опытах широкого масштаба.

Peculiarities of the Development of Alternatives in Relation to their Winter-Hardiness

A. K. FEDOROV

Institute of Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Moskva

Received April 7, 1959

Souhrn

Byly studovány zvláštnosti vývoje pšenice-přesívek podmiňující jejich zimovzdornost.

1. Dlouhodobá jarovisace pšenice-přesívek (alespoň 80 dní) značně urychluje jejich vývoj při podzimním termínu výsevu nebo při časnějších termínech výsevu na umělém krátkém dni. Za těchto podmínek je normálně vývoj přesívek vlivem krátkého dne silně zpomalen. U rychle se vyvíjejících jarovisovaných přesívek dochází ještě na podzim k diferenciaci vzrostného vrcholu a ke sloupkování, což se projeví na ztrátě jejich zimovzdornosti.

2. Podmínky nepřetržitého osvětlení rovněž urychlují vývoj přesívek při podzimních termínech výsevu. Pro rychlý vývoj spojený s diferenciací vzrostného vrcholu a sloupkováním dochází ke ztrátě zimovzdornosti.

3. Vlivem nízkých teplot dochází u přesívek ke změně reakce na krátký den. Po jarovisaci jsou takové pšenice schopny i vývoje na krátkém dni. Přesívka Noe vyžaduje ke změně reakce 35 dní, Česká přesívka a K 26191 45 až 50 dní jarovisace. V menší míře lze tuto vlastnost pozorovat i u jaří pěstovaných na krátkém dni.

4. Stanovení reakce na délku dne ukázalo, že u přesívek je toto období mnohem delší než u jarních odrůd. Tak u jarní pšenice *Lutescens* 62 trvá 21 dní, u přesívky Noe 45 dní. U stejné odrůdy Noe vysévané z jarovisovaných semen 24 dny, tj. téměř dvakrát méně.

Summary

Some peculiarities of the development of wheat alternatives causing their winter-hardiness were investigated.

1. Prolonged vernalization of wheat alternatives (for at least 80 days) considerably accelerates their development after autumn sowing or after earlier

sowing on an artificial short-day regime. Under these conditions the development of alternatives is normally slowed down considerably due to the short day. With rapidly developing vernalized alternatives the growing point is differentiated and shooting occurs in the autumn, which is reflected in the loss of their winter-hardiness.

2. Continuous illumination similarly accelerates the development of alternatives after autumn sowing. As a result of rapid development associated with a differentiation of the growing point and with shooting, winter-hardiness is lost.

3. Low temperatures bring about a change of the reaction of the alternatives to the short day. After vernalization such wheats can develop on the short-day regime. The alternative Noe requires 35 days for the reaction change to take place, the alternatives Česká přesívka and K 26191 require 45 to 50 days of vernalization. In a lesser degree this property may be observed even in spring wheats grown on the short-day regime.

4. The determination of the reaction toward day length showed that the period required is much longer with alternatives than with spring varieties. Thus with spring wheat *Lutescens* 62 the required period is 21 days, with the Noe alternative 45 days. The same Noe variety sown from vernalized seeds requires 24 days, i. e. almost one-half.

Introduction

Winter-hardiness of plants is closely associated with the type of their development.

The stage-development theory proposed by T. D. LYSENKO showed that the development of any trait or character, including winter-hardiness, depends on environmental conditions and on the stage in which the plant is. Numerous experiments have demonstrated that the process of winter-hardening of winter wheats is closely connected with the course of the vernalization stage. Most papers dealing with the study of developmental peculiarities describe work with winter varieties. Only little work has been carried out in the last years on the alternatives, although they are wide-spread among cultivated plants. Recently the topic was taken up by GLASNEROVÁ and TELTSCHEROVÁ (1952) and PETR (1955).

It is necessary to study the developmental peculiarities of alternatives not only in order to gain an understanding of the basis of alternative formation, but also to extend our knowledge regarding winter-hardiness, winter habit and perennial habit of plants. Knowledge of the basis of alternative formation is especially indispensable for the working out of more precise methods of planned plant alternation. It is known at present that forms of the alternative type occur, for example, during the transformation of spring into winter crops and *vice versa*.

In the present paper, based on the stage-development theory, an attempt has been made to elucidate those differences between alternatives and spring crops which bring about the winter-hardiness of the former.

Materials and Methods

Wheat (*Triticum aestivum* L.) was used throughout. Alternatives from various climatic zones were intentionally selected. The French variety Noe, the Austrian Waldviertel (K 26191 in the VIR catalogue), the Czech Česká přesívka and the Bulgarian 028 were used, in all there were 15 alternative varieties, but the remainder are not mentioned here explicitly. The following domestic spring and winter wheat varieties were used: spring wheats *Lutescens* 62 and *Moskevka*, winter wheats *Moskovskaya* 2453, *Kooperatorka*, *Lutescens* 329 and semi-winter wheat *Apulicum*.

Vernalization was carried out by the usual laboratory technique.

Results and Discussion

1. The Effect of Prolonged Vernalization on the Rate of Alternative Development

In this section the effect of long-term vernalization of alternatives on the rate of their development was investigated, using different sowing times. Sowing was carried out from spring till early autumn at intervals of 5 to 10 days with both vernalized and non-vernalized seeds. The duration of vernalization was in all cases at least 80 days. The results are shown in Table 1, which is abridged to show only the most important characteristics.

It follows from the table that on sowing in spring or in summer both the spring wheats and the alternatives come to ear in the normal way. Some alternative varieties come to ear with a short delay as compared with the spring crops, others (e. g. 028) come to ear simultaneously with them. When sowing is carried out in the autumn, the development of the alternatives is markedly delayed as compared with the spring crops. Thus after sowing on August 11, the alternative 028 displayed a differentiated growing point 20 days later, the K 26191 56 days later than the spring wheat *Lutescens* 62. With still later sowings (K 26191 and Noe on August 16, and 028 on August 26) no differentiation of the growing point could be observed before winter (just as winter wheats) and the plants wintered in the tillering phase. This is closely related to their winter-hardiness. It was observed with spring wheats that their growing point became differentiated and the shooting phase started even after late sowing. With spring or summer sowings vernalization affects the alternatives practically in the same way as the spring varieties. In some varieties the rate of development is practically unaffected, in others it brings about a certain acceleration. With autumn sowings vernalization considerably accelerates the development of alternatives, especially of those like Noe and K 26191. A substantial acceleration of alternative development can also be observed after late-summer sowings, but only on the short-day regime.

As mentioned above, alternatives from vernalized seeds develop and grow much more rapidly than plants from non-vernalized seeds, which must necessarily have an unfavourable effect on their winter-hardiness.

Thus with the Česká přesívka sown on September 6 from non-vernalized seeds, 51% plants survived the winter whereas from vernalized (50 days) seeds only 8%.

Table 1. The Effect of Date of Sowing on the Development of Wheats Sown from Vernalized and Non-Vernalized Seeds

Variety	Type of seed	Days between planting and											
		differentiation of the growing point						emergence of the ear					
		Date of sowing											
		5/5	1/6	1/8	6/8	11/8	16/8	5/5	1/6	1/8	6/8		
Lutescens 62 spring var.	non-vernalized	13	10	12	12	11	15	34	40	did not come to ear			
	vernalized	13	10	12	12	11	12	34	40	„			
26191 alternative	non-vernalized	24	24	53	57	67 no diff.		51	66	„			
	vernalized	14	10	14	15	24	34	42	48	„			
Noe alternative	non-vernalized	25	25	51	55	64 no diff.		52	67	„			
	vernalized	14	10	14	15	24	34	42	48	„			
028 alternative	non-vernalized	14	11	18	—	31	40	35	41	„			
	vernalized	14	11	12	—	11	12	34	41	„			
Apulicum semi-winter var.	non-vernalized	39 no differentiation										„	
	vernalized	18	12	16	—	—		41	45	„			
Moskovskaya 2493 winter var.	non-vernalized	no differentiation of growing point										„	
		16	10	16	17	29	—	40	42	„			
Lutescens 329 winter var.	non-vernalized	no differentiation of growing point										„	
	vernalized	17	12	22	21	33	48	42	46	„			

2. The Effect of Day Length on the Rate of Alternative Development

Under autumn short-day conditions, with low light intensity, lower temperature, i. e. under the conditions of autumn sowing, alternatives grow more slowly as compared with spring crops, which increases their winter-hardiness. This is more pronounced in the case of the winter-hardy varieties than of the less resistant ones.

Thus in one of our experiments with sowing on August 11, the growing point of the 028 alternative was differentiated 26 days later than that of the spring wheat *Lutescens 62*; the growing point of the *Česká přesívka* was differentiated 66 days later. The same regularity holds for the relation to growth intensity. Similar examples may be shown on perennial grass alternatives, Timothy grass, alfalfa, clover and others. This phenomenon can be used in plant breeding practice for a rough assessment of the winter-hardiness of a given plant.

Table 2. The Effect of Autumn Illumination on Plant Winter-Hardiness

Variety	Autumn illumination	State of plants before winter period	% winter
Moskovskaya 2453	natural	tillering	96.5
Česká přesívka	natural	undifferentiated growing point	94.0
K 26191	natural	undifferentiated growing point	95.3
Noe	natural	undifferentiated growing point	79.4
Moskovskaya 2453	continuous	undifferentiated growing point	98.7
Česká přesívka	continuous	shooting, growing point differentiated	0.9
K 26191	continuous	shooting, growing point differentiated	1.1
Noe	continuous	shooting, growing point differentiated	0.6
Moskovskaya 2453	9-hour-day	tillering	78.2
Česká přesívka	9-hour-day	undifferentiated growing point	82.2
K 26191	9-hour-day	undifferentiated growing point	80.3

The capacity of alternatives to slow down their development and growth due to the short day and other autumn conditions plays approximately the same role in their winter-hardiness as the vernalization stage in winter varieties. It retards the formation of reproductive organs and of autumn shooting thus bringing about plant adaptation.

Alternatives which for some reason shoot in the autumn forming embryonal ears do not acquire the necessary resistance.

An early-autumn sowing (when the day is still relatively long) also has a negative effect on the winter-hardiness of the alternatives, as in this case they may display embryonal ears and still shoot in the autumn.

In our experiments with wheat sowing on August 1, all the alternatives, including such winter-hardy varieties as the Česká přesívka and K 26191, froze while the winter variety Moskovskaya 2453 showed a resistance of 41%.

When sowing took place on September 6, when the plant growth and development proceeded on a relatively short-day regime, these alternatives survived just as the winter wheats Moskovskaya 2453 and *Lutescens* 329 and even better than the Kooperatorka. In this case the alternatives wintered as did the winter varieties in the phase of tillering with non-differentiated growing points.

When the short day, as one of the factors retarding the development and growth of alternatives in autumn was artificially prolonged, by supplying light during the dark periods, winter-hardiness of the alternatives decreased.

On August 21, a number of alternative varieties were sown on an illuminated plot. After germination plants were exposed to different light conditions: 1. continuous illumination, natural plus artificial with normal 500 W incandescent bulbs, of an intensity of about 4000—6000 lx.; 2. normal day; 3. short nine-hour day.

Table 2 shows that light conditions in autumn have a considerable influence on the winter-hardiness of the alternatives. Complete freezing was observed with alternatives after continuous illumination, which is connected with their rapid growth and development under such conditions. After normal- or short-day regime alternatives wintered as satisfactorily as winter wheat.

It is necessary to time the sowing of the alternatives so that they cannot shoot before the onset of winter but are able to develop sufficiently. The same holds for perennial grass alternatives.

3. The Change of Reaction toward Day Length due to Low Temperatures

It was shown above that alternatives after a prolonged influence of low temperatures (approximately the same as the vernalization stage of winter varieties) display a markedly smaller retardation of growth and development on a short-day regime, as compared with alternatives not treated with low-temperature exposure. This may be related to the fact that in the alternatives a change of reaction toward the short day takes place under the influence of prolonged low temperature. This property is of great importance for their normal growth and development in the spring after wintering. The alternatives are grown mostly in places where spring begins early (when the day is still short) and if the short-day reaction remained the same as in autumn, their growth and development would be needlessly retarded and yields would be reduced.

Experiments on the determination of the period required to produce the short-day reaction change revealed that the wheat Noe requires 35 days, the Česká přesívka and the 26191 alternative require 45 to 50 days of low-temperature exposure.

Hence it follows that the alternatives require a relatively long time for the short-day reaction to change, approximately the same or only a little less than related winter varieties would require for vernalization. Under field conditions in autumn the change of reaction in the alternatives takes place at the same time or somewhat earlier than the related winter varieties terminate their vernalization stage. It is interesting that this property of changing the short-day reaction by a prolonged low-temperature exposure is to a certain degree inherent even in the spring varieties. Thus, for instance, in our experiments with the spring wheat Moskovskaya sown in autumn from vernalized (for 50 days) seeds on the natural-day regime, the development is accelerated by some 4 to 5 days as compared with spring or summer sowing. After spring or summer sowing, on the 12-hour-day regime plants from vernalized seeds come to ear 3 to 4 days earlier than plants from non-vernalized seeds.

4. Photoperiodic Sensitivity of Alternatives

It was shown by determining the duration of the reaction to day length that this period is much longer in alternatives than in spring varieties. Thus it lasts 21 days in the *Lutescens* 62, as compared with 45 days in the Noe alternative. In the same Noe variety sown from vernalized seeds it lasted 24 days, i. e. almost one-half.

Acknowledgment:

The author wishes to express his thanks to Ing. J. Krekule (Praha) for his friendly help in preparing the manuscript.

References

- GLASNEROVÁ, E., TELTSCHEROVÁ, L.: Příspěvek k objasnění fyziologické podstaty přesívek [Remarks on the physiological basis of alternatives]. — Čs. biologie (Praha) 1 : 13—17, 1952.
PETR, J.: Některé zvláštnosti biologie českých přesívek [Some peculiarities of the biology of Czech alternatives]. — Sborník VŠZ (Praha) : 181—188, 1955.

Address: Alexandr K. Fedorov, Institute of Genetics, Academy of Sciences of the USSR, Leninsky prospekt 33, Moskva V-71.

Александр К. Федоров, Институт генетики АН СССР, Ленинский проспект 33, Москва В—71.

BIOL. PLANT. 1 (4) : 295—301, 1959

Особенности развития пшениц-двуручек в связи с их зимостойкостью

А. К. ФЕДОРОВ

Институт генетики Академии наук СССР, Москва

Поступило 7 апреля 1959 г.

Резюме

Были исследованы особенности пшениц-двуручек, обуславливающие их зимостойкость.

1. Длительная яровизация пшениц-двуручек (по крайней мере 80 дней) сильно ускоряет их развитие при осенних сроках посева, или при более ранних сроках посева в искусственных условиях короткого дня. При этих условиях развитие двуручек под влиянием короткого дня обычно сильно замедлено. У быстро развивающихся яровизированных двуручек еще осенью имеет место дифференциация точки роста и образование зачаточного колоса, что влечет за собой потерю их зимостойчивости.

2. Круглосуточное освещение также ускоряет развитие двуручек при осенних сроках посева. Вследствие быстрого развития, связанного с дифференциацией точки роста и образованием зачаточного колоса, имеет место потеря зимостойчивости.

3. При воздействии низких температур у двуручек имеет место изменение реакции на короткий день. После яровизации эти сорта пшеницы способны развиваться также в условиях короткого дня. Двуручке сорта Ноэ для перемены реакции необходимо 35 дней, чешской двуручке и сорту К 26191 — 45—50 дней. Это свойство можно в меньшей степени наблюдать также и у яровых пшениц, разводимых в условиях краткого дня.

Повышение титров сывороток при помощи иммунизации преципитат-антигеном из растительного материала

Евгений Ермольев и Иржи Поздена

Научно-исследовательский институт растениеводства ЧСАСХН, Прага-Рузыне
и Биологический институт ЧСАН, отдел фитопатологии, Прага-Дейвице

Поступило 10 апреля 1959 г.

Souhrn

Autoři popisují princip metody zvyšování titrů antisér proti fytopatogenním virům, mykosám a bakteriosám pomocí imunisace precipitátem antigenu s antisérem podle DUNINA (1958). Ze substrátu obsahujícího virus, bakterie nebo spory hub se vysráží příslušným předem připraveným homologním antisérem precipitát, který se po odstředění suspenduje v malém množství fyziologického roztoku a touto suspensí (precipitát-antigenem) se imunisuje.

Metoda byla použita pro přípravu některých diagnostických antisér u rostlinných viros a bakteriosy. Tak např. u antiséra proti virové žloutence řepy cukrové (Beta virus 4) se podařilo zvýšit titr antiséra 8krát, pokud se pracovalo s čerstvou šťávou. Nepodařilo se však zvýšit titr, jestliže se pracovalo se šťávou konzervovanou glycerolem.

Při přípravě antiséra proti *Pseudomonas lachrymans* (Sm. et Br.) se imunisací pomocí precipitát-antigenu zvýšil titr séra 4krát proti séru, které bylo připraveno normálním způsobem.

U antisér proti viru tabákové mosaiky připravených pomocí precipitát-antigenu byly titry zvýšeny 4krát.

Touto metodou se podařilo připravit antisérum proti X viru brambor ze šťávy bramborových hlíz obsahujících X virus brambor. Titr byl však menší než u séra připraveného z tabákových listů infikovaných X virem.

Při přípravě antisér proti virové žloutence řepy (Beta virus 4) ze šťávy z bulvy řepy metodou imunisace precipitát-antigenem séra nereagovala ani se šťávou z kořenů ani z listů virosní řepy.

Резюме

Описывается принцип метода повышения титров сывороток против фитопатогенных вирусов, грибных и бактериальных заболеваний при помощи иммунизации преципитатом антигена с сывороткой по Дунину

(1958). Из субстрата, содержащего вирус, бактерии или споры грибов, заранее приготовленной гомологичной сывороткой осаждается преципитат, который после центрифугирования суспензируется в небольшом количестве физиологического раствора; в дальнейшем при помощи этой суспензии (преципитат-антигена) и производится иммунизация.

Метод был использован для приготовления некоторых диагностических сывороток для вирусных и бактериальных заболеваний растений. Так, например, у сыворотки против вирусной желтухи сахарной свеклы (*Beta virus 4*) удалось при работе со свежим соком повысить титр сыворотки в 8 раз. Однако, повысить титр не удалось при работе с соком, консервированным глицеролом.

При приготовлении сыворотки против *Pseudomonas lachrymans* (Sm. et Br.) путем иммунизации преципитат-антигеном повысился титр сыворотки в 4 раза по сравнению с сывороткой, приготовленной нормальным способом.

У сывороток против мозаики табака, приготовленных при помощи преципитат-антигена, титры были увеличены в 4 раза. При помощи этого метода удалось приготовить сыворотку против X-вируса картофеля из сока картофельных клубней, содержащих этот вирус. Титр был, однако, меньше, чем у сыворотки приготовленной из листьев табака, зараженных X-вирусом.

При приготовлении сывороток против вирусной желтухи сахарной свеклы (*Beta virus 4*). из сока корня свеклы методом иммунизации преципитат-антигеном, сыворотки не реагировали ни с соком из корней, ни с соком из листьев вирусной свеклы.

Введение

При серологических исследованиях растительных вирусов проявляется часто необходимость в высоком титре сывороток. Сыворотки против растительных вирусов, как правило, обладают гораздо более низкими титрами чем сыворотки применяемые обычно при серологических исследованиях заболеваний человека и животных. Низкие титры сывороток против растительных вирусов часто делают невозможными некоторые серологические работы.

Также при массовом проведении серологических тестов, например, в картофелеводстве, расход сывороток бывает очень высок и его можно было бы снизить при повышении титра сывороток. Сыворотка с более высоким титром позволяет большее разведение и ею можно исследовать большее количество растений при одинаковом расходе сыворотки и одинаковой чувствительности реакции. Одним из способов повышения титров сывороток, которые рекомендует Дунин (1958), является иммунизация при помощи преципитата-антигена с сывороткой. Этот метод можно, по мнению Дунина, использовать не только для растительных вирусов, но также и для фитопатогенных бактерий и грибов.

Принцип метода заключается в том, что из субстрата содержащего вирус, бактерии или споры грибов при помощи соответствующей гомологичной

сыворотки осаждаются антигены; после центрифугирования преципитат суспензируется в небольшом количестве физиологического раствора и в дальнейшем, при помощи этой суспензии производится иммунизация. Таким образом антиген очищается от балласта — хлоропластов, токсических веществ, липоидов и других примесей, причем одновременно антиген концентрируется. Особенно важным, как указывает Дунин, оказывается то обстоятельство, что при этом способе многие антигены теряют свою токсичность и не вызывают у животных при внутривенном применении патологических осложнений. Титр и активность сывороток при этом в некоторых случаях значительно повышаются.

Соединение антител с антигеном происходит вначале без заметных изменений. Лишь через некоторое время, притом довольно краткое, появляются признаки реакции — флоккуляция, агглютинация, преципитация, лизис и т. д. Количество преципитата зависит также от отношения количеств смешиваемых антител и антигена. В случае, когда обе составные части полностью выпали в осадок, мы говорим о зоне эквивалентности. В случае избытка антигена преципитация может не произойти. Избыток антител в сыворотке кролика не имеет значения для хода преципитации. Антитела из лошадиной сыворотки, наоборот, находясь в избытке, могут вызвать торможение преципитации. Постепенное увеличение количества антител из кроличьей сыворотки, прибавляемых к определенному количеству антигена, влечет за собой образование большего количества осадка. При постепенном повышении количества прибавляемых антител из лошадиной сыворотки имеет место сначала повышение количества осадка, но после определенного максимума количество осадка быстро уменьшается, так как соединения с большим количеством антител начинают быть растворимыми (Нейрат и Бэйли 1958). В таком случае анализ становится затруднительным.

Так как антитела и антигены являются белками, то на течение реакции между ними влияют все факторы действующие на молекулы белка, главным образом рН окружающей среды, присутствие солей тяжелых металлов и т. д. Вследствие этого получаются ошибочные результаты, если реакция не проводится при нейтральном рН, или же если в качестве антисептиков для сывороток применяется мертиолат или другие подобные соединения (Хауровиц 1958).

При использовании преципитат-антигена для иммунизации лучше всего соединять антитела с антигеном в эквивалентном количестве, которое можно заранее определить путем реакции сыворотки с антигеном при разбавлении (диаграмма преципитации).

Опыты и результаты

Тогда как Дунин в своих опытах занимался, главным образом бактериями и грибами, за исключением вируса табачной мозаики и X-вируса картофеля, мы в нашей работе сосредоточили свое внимание на вирусных заболеваниях, прежде всего на желтухе сахарной свеклы (*Beta virus 4*). X-вирус картофеля и вирус табачной мозаики мы также исследовали, но только с иной целью. В случае с X-вирусом картофеля нам было

важно приготовить сыворотку из сока клубней, по вирусу табачной мозаики мы работали с очищенным препаратом. Из бактерий в наших опытах применялась *Pseudomonas lachrymans* (Sm. et Br.), с которой Дунин не работал.

1. Приготовление сыворотки против вирусной желтухи сахарной свеклы при помощи преципитат-антигена

Листья сахарной свеклы, дающие положительную реакцию с сывороткой против желтухи свеклы, размалываются на мясорубке и из них выжимается сок, который разбавляется физиологическим раствором в отношении 2 : 1 и далее центрифугируется в течении 5 минут при 11500 оборотов в минуту (8860 г). К супернатанту прибавляется заранее приготовленная диагностическая кроличья сыворотка (Жермолев 1958) в эквивалентном количестве установленном по диаграмме преципитации. Смесь отстаивается в течении 1 часа при температуре 37°, причем временами перемешивается. Затем смесь центрифугируется 5 минут при 11 500 оборотов в минуту и осадок суспензируется в физиологическом растворе в одной пятой объема первоначального количества сока. Суспензия фильтруется через вату и ею проводится иммунизация.

Кролики переносят иммунизацию преципитат-антигеном очень хорошо, без осложнений. Иммунизация кроликов проводилась по нашему способу внутривенно постепенно увеличивающимися дозами: 1 мл, 1,5 мл, 2 мл, день отдыха, 2,5 мл, 3 мл, день отдыха, 3,5 мл, 4 мл, взятие крови через 6 дней.

Титр приготовленной сыворотки был равен 1 : 512, титр сыворотки, использованной для приготовления антиген-преципитата — 1 : 64. Таким образом, путем иммунизации антиген-преципитатом нам удалось повысить титр сыворотки в 8 раз.

Мы попытались приготовить сыворотку против вирусной желтухи сахарной свеклы также из отцентрифугированного сока листьев больной свеклы, консервированного глицеролом (1/4 объема). Способ иммунизации был тот же, как и в предыдущем случае, причем был принят во внимание объем прибавленного глицерола. Титр свежее приготовленной сыворотки был равен 1 : 64, то-есть такой же, как и титр сыворотки применявшейся при приготовлении преципитат-антигена. Причина, почему не произошло повышения титра, заключалась в том, что консервированный сок содержал меньшее количество вируса, чем свежий. Поэтому при изготовлении сыворотки при помощи преципитат-антигена с целью повышения титра сыворотки необходимо использовать антиген в большем количестве, концентрировать его путем преципитации в 5—10 раз; лишь тогда можно ожидать повышения титраготавливаемой сыворотки.

Табл. 1. Ход иммунизации кролика

Дни	Количество микробных тел в миллиардах	Сыворотка в мл (1 : 50)	Количество физ. раствора в мл для пригот. суспензии преципитат- антигена	Количество мл суспензии для иммунизации
1	1	1	1	0,5
5	1,5	1,5	1,5	1
9	2,5	2,5	2,5	2
12	3,5	3,5	3,5	3
15	3,5	3,5	3,5	3
21		взятие крови		

Титр вновь приготовленной сыворотки был равен 1 : 2560, то есть в четыре раза выше первоначального.

2. Приготовление сыворотки против *Pseudomonas lachrymans* (Sm. et Br.) при помощи преципитат-антигена

Приготавливается взвесь 24-часовой культуры бактерии *P. lachrymans* в концентрации 1 миллиард микробных тел в 1 мл. Соответствующее количество суспензии центрифугируется, жидкость сливается и к осадку с бактериями прибавляется соответствующее количество сыворотки, разбавленной физиологическим раствором в отношении 1 : 50. Смесь отстает 2 часа при 37 °С, затем центрифугируется, преципитат смешиваем с малым количеством физиологического раствора, фильтруем через вату и производим иммунизацию, которая проводится следующим образом: (Табл. 1.)

3. Приготовление сыворотки против вируса табачной мозаики при помощи преципитат-антигена

Опыт ставил своей целью проверку возможности применения метода иммунизации посредством преципитат-антигена очищенных и концентрированных вирусов. Исходным материалом послужил пурификат вируса табачной мозаики зеленого штамма ВТМ, концентрация которого составляла 0,3 г ВТМ в литре физиологического раствора. Этот пурификат, хранившийся при +3 °С позднее был использован для определения титра сыворотки.

В предварительных опытах мы исследовали различия между иммунизацией при помощи нормального антигена ВТМ и преципитат-антигена ВТМ. Преципитат-антиген приготавливался смешением 1 части (по объему) антигена ВТМ и 1 части сыворотки против ВТМ, разбавленной физиологическим раствором в отношении 1 : 125. Смесь стояла 1 час при комнатной температуре и временами перемешивалась. После того как произошло соединение антигена ВТМ с гомологичной сывороткой, что проверялось под микроскопом, эта смесь и была использована для иммунизации в качестве преципитат-антигена. Иммунизация производилась одинаковыми объемами как нормального антигена, так и преципитат-антигена. В действительности же, животные иммунизированные преципитат-антигеном, получили в два раза меньшую дозу антигена, так как последний разбавлялся сывороткой в отношении 1 : 2. Титры полученных сывороток были почти одинаковы. Это свидетельствует о том, что по всей вероятности, при иммунизации преципитат-антигеном имеет место почти одинаковая степень образования антител даже у животных, которые получили в два раза меньшую дозу антигена по сравнению с контрольными, иммунизированными нормальной дозой антигена.

В дальнейших опытах мы занимались повышением титра сывороток ВТМ при помощи иммунизации преципитат-антигеном. В этом случае мы пользовались постоянным антигеном, т. е. чистым пурификатом ВТМ в физиологическом растворе. Часть этого антигена была использована прямо для иммунизации для контроля, часть подвергалась преципитации с сывороткой против ВТМ. Нам интересовало главным образом то, чтобы антиген содержал как можно больше вирусных белков. Это достигалось путем преципитации антигена при помощи сыворотки. Чтобы различия между контрольной группой животных, иммунизированных нормальным антигеном, и группой, иммунизированной преципитат-антигеном, были более явственными, мы применяли для приготовления преципитат-антигена в 10 раз большее количество антигена. При нормальной иммунизации кроликов необходимо, при использованном нами методе, 17,5 мл антигена для одного кролика в течение всего времени иммунизации. Преципитат-антиген, однако, приготавливался из 175 мл антигена, осажденного сывороткой против ВТМ. Для каждой инъекции преципитат-антиген приготавливался отдельно, притом таким образом, что к нормальному антигену прибавлялась сыворотка в эквивалентном количестве, установленном на основе ориентировочных реакций антигена с сывороткой. После часового стояния при комнатной температуре пробирки с содержащимся в них антигеном и сывороткой центрифугируются при 3000 оборотах в минуту в течение 10 минут (1700 г). Осадок растворяется в физиологическом растворе в количестве соответствующим $\frac{1}{10}$ первоначального объема. Иммунизация производилась путем внутривенного введения по обычному способу, описанному на стр. 38.

Опыты показывают, что, действительно, при использовании иммунизации при помощи преципитат-антигена, получают сыворотки с высшими титрами. В то время

как у контрольных сывороток титр составлял 1 : 64 и 1 : 32, у сывороток полученных путем иммунизации при помощи преципитат-антигена титр достигал 1 : 256 и 1 : 128. Одним словом, эти сыворотки реагировали еще в тех условиях, когда контрольные сыворотки не давали уже никакой реакции. Отличия между обоими группами могли быть еще более явственными, по нашему мнению, особенно в том случае, если бы в качестве контроля и при приготовлении преципитат-антигена был бы использован пурификат, еще более разбавленный, чем в наших опытах.

Важной особенностью сывороток, приготовленных при помощи преципитат антигена является то, что предел разбавления антигена в диаграмме преципитации в 2 раза выше, чем при реакции с сывороткой, приготовленной нормальным способом. Это наблюдалось не только в случае вируса табачной мозаики, но и в случаях других антигенов.

Возможность концентрирования антигенов вирусов путем преципитации при помощи сыворотки использовалась в целях определения присутствия вируса X в клубнях картофеля и вируса желтухи в корнях сахарной свеклы. В этих обоих случаях преципитат-антигены соответствующих вирусов применялись для приготовления диагностических сывороток.

4. Приготовление сыворотки против X вируса картофеля путем иммунизации кроликов при помощи преципитата сока клубней, зараженных X вирусом

Сок из клубней (область сосудистых пучков) растений сортов *Dianella* и *Jubel*, у которых на листьях можно было наблюдать признаки заболевания вирусом X, центрифугировался в течении 5 минут при 11 500 оборотах в минуту. Затем прибавлялась сыворотка против вируса X, заранее приготовленная из табачных листьев, зараженных вирусом X. После двухчасовой инкубации в термостате при 37 °C смесь снова центрифугировалась. Преципитат суспензировался в физиологическом растворе ($1/7$ исходного объема сока) и после фильтрации через вату применялся для иммунизации кроликов.

Свеже приготовленная сыворотка реагирует положительно со свежим соком из растений табака, зараженных вирусом X. Титр свежее приготовленной сыворотки, однако, довольно низок 1 : 32 по сравнению с 1 : 256 у сыворотки, применявшейся для осаждения вирусов из сока клубней картофеля. Это значит, что вирус X находится в клубнях в незначительном количестве. В некоторых случаях вирус можно обнаружить прямо при помощи капельного метода. Дунин также приводит случай, что вирус X можно обнаружить прямо в клубнях (Дунин 1958). Для прямого диагноза вируса в клубнях картофеля необходимо, однако, перед анализом повысить его концентрацию.

5. Приготовление сыворотки против вируса желтухи сахарной свеклы из корней свеклы при помощи преципитат-антигена

Сок из клубней больных растений свеклы, выжатый из столбиков, вырезанных из клубней в поперечном направлении при помощи пробочного перфоратора, центрифугируется в течении 5 минут при 11 500 оборотах в минуту. Затем прибавляется соответствующее количество сыворотки против желтухи свеклы (применялась та же сыворотка, как и в предыдущем случае) и после одночасовой инкубации в термостате при 37 °C снова центрифугируется при 11 500 оборотах в минуту. Осадок суспензируется в физиологическом растворе, в объеме, соответствующем $1/8$ — $1/7$ исходного объема сока. Затем суспензия фильтруется через вату и применяется для нормальной внутривенной иммунизации кролика.

Приготовленная сыворотка проверялась при помощи сока из корней и листьев здоровых и больных растений свеклы. Во всех случаях получились отрицательные результаты. Сыворотка, приготовленная из листьев растений свеклы больных желтухой, также не дала положительной реакции с соком из корней растений больных желтухой.

В каждом варианте применялись 2 кролика. Титры сывороток соответствующей пары кроликов были всегда или совсем одинаковыми или же их различия не выходили за рамки одного разбавления.

В первом варианте опыта (приготовление сыворотки против вирусной желтухи сахарной свеклы при помощи преципитат-антигена) один кролик погиб вследствие травмы.

Дискуссия

По мере все более широкого применения серологического метода в целях изучения и диагностики фитопатогенных организмов все более проявляется необходимость в повышении титров сывороток.

По сравнению с другими методами, метод иммунизации при помощи преципитат-антигена обладает тем преимуществом, что здесь повышение концентрации антигена достигается без применения химических реактивов. Повидимому, в связи с этим при иммунизации не имеют места разные неблагоприятные явления, обычные после применения химических реактивов (некроз ушей, шоки и т. д.). Недостатком этого метода является то, что он требует гораздо больше времени (если учесть, что вначале необходимо приготовить гомологическую сыворотку) и что необходимо иметь большое количество животных. При помощи этого метода можно в некоторых случаях значительно повысить титр сывороток.

Не удалось получить положительную реакцию при приготовлении сывороток против вируса желтухи сахарной свеклы из сока корней больных растений. Может быть, причиной этого является то обстоятельство, что концентрация вируса в корнях слишком низка чтобы вызвать образование специфических антител или же сам процесс серологической реакции. Авторы не ставили перед собой цель вскрыть причины отрицательных результатов в данном случае; теоретически, однако, возможны и другие объяснения данного явления: применявшиеся методы не позволяют выделить вирусные частицы из тканей корня или же присутствующие ингибиторы тормозят реакцию, не говоря уже о том, что не исключено также существование начальных форм вирусов, не дающих серологических реакций.

Вирус X находится в клубнях картофеля в очень низкой концентрации, но все же из сока клубней при помощи преципитат-антигена можно приготовить диагностическую сыворотку, хотя и с более низким титром. Это свидетельствует о возможности использования данного метода при исследовании вирусов, концентрация которых в растениях очень низка.

Литература

- Душин, М. С.: О некоторых методах получения и применения антивозбудительных сывороток в фитопатологии и энтомологии. — Вестник с.-х. науки, 3 : 43—55, 1958.
- Хауовиц, Ф.: Химия и биология белков. (Перевод) — Москва, 1958.
- Нейрат, Г., Бэйли, К.: Биохимия белковых веществ. (Перевод) — Москва, 1958.
- Ермольев, Е.: Nový způsob přípravy antiser proti bramborovému viru X a proti viru žloutenky řepy cukrové. (Новый метод приготовления сывороток против вируса X и против вируса желтухи сахарной свеклы). — Sborník ČSAZV — Rostlinná výroba 4 : 1127—1130, 1958.
- Адрес: Dr. Evžen Jermoljev, Výzkumný ústav rostlinné výroby ČSAZV, Praha-Ruzyně.
Ing. Jiří Pozděna, Biologický ústav ČSAV, odd. fytopathologie, Praha-Dejvice,
Na Karlovce 1.

BIOL. PLANT. 1 (4) : 302—309, 1959

Increase of Antiserum Titres by means of Immunization with Plant-Material Precipitate-antigen

EVŽEN JERMOLJEV and JIŘÍ POZDĚNA

Institute for Plant Production Research, Czechoslovak Academy of Agricultural Sciences, Praha-Ruzyně, and Institute of Biology, Czechoslovak Academy of Sciences, Praha-Dejvice

Received March 1, 1959

Summary

A description is presented of the principle of the method of increasing titres of antisera against phytopathogenic viruses, mycoses and bacterioses by immunizing with a precipitate-antigen according to DUNIN (1958). To a substrate containing viruses, bacteria or fungus spores, corresponding homologous antiserum prepared in advance is added to obtain a precipitate which is centrifuged and suspended in a small amount of physiological saline; this suspension (the precipitate-antigen) is used for immunization.

The method was used for the preparation of some diagnostic antisera of plant virus diseases and bacterioses. Thus, the antiserum against yellows in sugar beet (*Beta virus 4*) had its titre increased eight times as long as fresh juice was used for work. However, it was not possible to increase the titre if glycerol-preserved juice was used.

In preparing the antiserum against *Pseudomonas lachrymans* Sm. et Br., immunization by means of the precipitate-antigen brought about four-fold increase in serum titre as compared with the serum prepared in the usual way.

Antisera against tobacco-mosaic virus prepared by using the precipitate-antigen possessed a four times higher titre.

The above method was successfully used to prepare an antiserum against the potato virus from potato tuber juice containing the potato X virus. The titre, however, was lower than in the serum prepared from tobacco leaves infected with the X virus.

In preparing antisera against yellows in sugar beet (*Beta virus X*) from the juice of the beet root by means of the precipitate-antigen immunization, the sera did not react either with the juice from the roots or with that from the leaves of virus infected sugar beet.

Modellstudien und Beobachtungen über die Gruppe der virösen Akarprien (Strolbur und Vergilbungen) an *Anagallis arvensis* L.

ČTIBOR BLATNÝ

Biologisches Institut der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften,
phytopathologische Abt., Praha

Eingegangen am 15. April 1959

Souhrn

1. *Anagallis arvensis* L. (v dalším *A. a.*) má nízkou klíčivost, ale dá se snadno vegetativně množit. Dá se snadno roubovat. Při roubování na láhev je inkubační doba krátká, nejkratší až 8 dnů. Roubování křížem, tj. protažením na povrchu seříznutého nemocného stonku podélným otvorem ve stonku, je jen teoreticky významné.

2. Květy zdravých *A. a.* se zavírají na noc. Květy třepenité zůstávají déle otevřené. Květy s redukovanými korunami mají koruny neopadavé, po měsíce otevřené. U nás počíná *A. a.* kvést venku koncem května, končí v polovině října, ve skleníku, když délka dne činí $12\frac{1}{2}$ —13 hodin.

3. Hladina viru v rostlinách *A. a.* se mění podle ontogenetického vývoje hostitelské rostliny v závislosti na její fotoperiodicitě. K reprodukci viru dochází teprve, když délka dne dosáhla nejméně 12 hodin. Viry této skupiny mohou být v rostlinách též latentní.

4. U Liptovského Hrádku na Slovensku jsme našli formu *A. a.* s menšími, rezavě červenými korunami. První známky ochuravění *A. a.* žloutenkou se u nás objevily koncem června 1957, v r. 1958 až koncem července. Nemocné *A. a.* produkují klíčivé semeno jen na spodních tobolkách, vyvinuvších se před nákazou. Víroso může mít v přírodě rozhodující vliv na frekvenci *A. a.* *A. a.*, *Stellaria media* a *Veronica chamaedrys* mohou být indikátory přítomnosti virů a viros ze skupiny akaprií (stolburu, žloutenek, purple-topu, yellow-topu u brambor). *Stellaria media*, jakožto rostlina ozimá a snášející mrazy (nejméně -25°C), může být reservoirovou rostlinou virů této skupiny.

5. K prolifkacím u *A. a.* dochází od září do listopadu. Napřed jsou „květné“, později jen „listové“.

6. Třepenitost korun u *A. a.* může být jedním z prvních příznaků žloutenkového ochuravění; vyskytuje se u *A. a.* při přenosu metlovitosti bramborů, green petals jahodníků, fylodie jetelů, fylodie *Plantago major*; též u rostlin trpících bakteriálním hnědnutím paty stonku, přechodně pak — možná jako důsledek intoxikačních látek z cizí podnože — po naroubování zdravých *A. a.* na nitovité klíče bramborů.

7. *A. a.* velmi těžce virosou ochuravělé nekvetou vůbec, silně větvi a místo květů vytvářejí listové rosety.

Zúžení, vlnění a anthokyanisace listů nejsou vždy charakteristické pro žloutenkovou virosu *A. a.*

Rouby nemocné *A. a.* u *Nicotiana glutinosa* nevyvolaly chorobné příznaky pravděpodobně v důsledku prudké intoxikace a rychlého odumření roubů *A. a.*

Rouby nemocné *A. a.* u mladých semenáčů bramborů vyvolaly nedělení lístků, vývin dlouhých tenkých stonků a nadzemních hlízek, zčásti naměkklých a s nitovitými klíči, v několika případech příznaky yellow-topu. Výhony z těchto nitovitých klíčů byly naroubovány na rajčata, u rajčat vyvolaly silnější větvení, abortaci pupat, zřídka i zakrnění a zezelenání korun — (pseudoklasický stolbur = virus ze skupiny evropské žloutenky aster).

Rouby nemocných *A. a.* vyvolaly u rajčat podobné zjevy. Rouby metlovitých bramborů naroubované na *Anagallis linifolia* způsobily u ní jen menší a bledší koruny.

8. K reproduci viru dochází — na základě pokusů s roubováním nemocných roubů *A. a.* na zdravé podnože *A. a.* v době od začátku II. do konce III., — když den dosáhl nejméně 12½–13 hodin. Virus tím sleduje zvýšenou tvorbu bílkovin ve fázi připravenosti hostitelské rostliny ke květu. Zimní pokles množství viru v rostlině může vést habituálně až k nulové hladině (též v pampeliškách, v hlízách bramborů, v *Cynanchum vincetoxicum*, *Convolvulus arvensis*). Nepatrné je toto kolísání u *Stellaria media*, která kvete, když je den delší než 8½ hodin.

9. Cikadofilní viry jsou dokonalé přízpůsobeny živočišným hostitelům (jsou v nich persistentní, často transovariálně přenosné, často s dlouhou celacní dobou, na rostliny mechanicky nepřenosné). Svým rostlinným hostitelům pak přízpůsobeny nejsou (škodí jim, jsou u nich mechanicky nepřenosné, hladina jejich množství v nich značně kolísá, je závislá na ontogenetickém vývoji a fotoperiodismu rostliny). Lze proto cikadofilní viry této skupiny považovat za viry původně živočišné, které teprve později přešly na rostliny a staly se tím více méně viry obojživelnými.

Zusammenfassung

1. *Anagallis arvensis* L. (im weiteren *A. a.*) besitzt eine niedrige Keimfähigkeit, aber lässt sich leicht vegetativ vermehren und pflanzen. Beim Pfropfen „auf die Flasche“ ist die Inkubationsdauer kurz, minimal bis 8 Tage. Die Pfropfung „übers Kreuz“, das heisst das Durchziehen des abgeschnittenen kranken Stengels durch eine Längsöffnung im Stengel, der gepfropft wird, ist nur theoretisch von Bedeutung.

2. Die Blüten gesunder *A. a.*-Exemplare schliessen sich bei Nacht. Die fransenförmigen Blüten bleiben länger geöffnet. Blüten mit reduzierten Blütenkronen besitzen nicht abfallende, Monate lang geöffnete Kronen. Bei uns beginnt *A. a.* in der freien Natur gegen Ende Mai zu blühen, im Glashause, sobald die Tageslänge 12½ bis 13 Stunden ausmacht.

3. Der Virusspiegel ändert sich in den *A. a.*-Pflanzen je nach der ontogenetischen Entwicklung der Wirtspflanze im Zusammenhang mit ihrer Periodizität. Zur Reproduktion des Virus kommt es erst, wenn die Tageslänge mindestens 12 Stunden erreicht hat. Die Viren dieser Gruppe können in den Pflanzen auch latent vorhanden sein.

4. Bei Liptovský Hrádok in der Slowakei haben wir eine Form *A. a.* mit kleinen rostrot gefärbten Kronen gefunden. Die ersten Anzeichen einer Erkrankung von *A. a.* an Vergilbung traten bei uns Ende Juni 1957 und im

Jahre 1958 erst Ende Juli in Erscheinung. Die kranken *A. a.* — Exemplare bilden keimfähige Samen nur in den unteren Kapseln, die sich vor der Infektion entwickelt hatten. Die Virose kann in der Natur einen entscheidenden Einfluss auf die Frequenz von *A. a.* haben.

A. a., *Stellaria media* und *Veronica chamaedrys* können Indikatoren der Anwesenheit von Viren und Virosen aus der Gruppe der Akarpien sein (Stolbur, Vergilbungen, purple-top und yellow-top bei Kartoffeln). *Stellaria media* kann als überwinternde Pflanze, die selbst Fröste (mindestens -25°C) verträgt, eine Reservoirpflanze der Viren dieser Gruppe sein.

5. Zu Prolifikationen bei *A. a.* kommt es von September bis November. Zuerst werden dabei auch die Blüten, später nur die Blätter gebildet.

6. Die Fransenförmigkeit der Blütenkronen bei *A. a.*, kann eines der ersten Anzeichen von Vergilbungserkrankung sein. Es tritt bei Übertragung der Hexenbesenkrankheit der Kartoffeln, der green petals der Erdbeerstauden, der Phyllodie bei Kleearten und bei *Plantago major* in Erscheinung, sowie auch bei Pflanzen, die an bakteriellem Braunwerden der Stengelbasis leiden, sodann auch vorübergehend als mögliche Intoxikationsfolge der fremden Unterlage nach einer Pfropfung gesunder *A. a.*-Exemplare auf fadenförmige Kartoffelkeime.

7. *A. a.*-Exemplare, die sehr schwer an Virose erkrankt sind, blühen überhaupt nicht, verzweigen sich aber stark und bilden anstelle der Blüten Blattrosetten.

Verengung, Welligwerden und Anthokyanisierung der Blätter sind nicht immer charakteristische Kennzeichen für eine Vergilbungsvirose von *A. a.*

Pfropfreiser kranker *A. a.*-Exemplare riefen bei *Nicotiana glutinosa* wahrscheinlich infolge einer heftigen Intoxikation und eines raschen Absterbens der aufgepfropften Pflanzenteile von *A. a.* keine Krankheitssymptome hervor.

Pfropfreiser kranker *A. a.*-Exemplare bewirkten bei jungen Sämlingen von Kartoffeln die Bildung ungeteilter Blätter, die Entwicklung langer, dünner Stengel und oberirdischer Knollen, die teilweise weich wurden und fadenförmige Keime bildeten, in einigen Fällen die Anzeichen von yellow-top. Die Triebe solch fadenförmiger Keime riefen, wenn sie auf Tomaten aufgepfropft wurden, bei diesen eine stärkere Verzweigung, ein Abfallen (Abortation) der Knospen, seltener auch eine Verkümmern und ein Grünwerden der Kronen (pseudoklassischer Stolbur = eine Virose aus der Gruppe der europäischen aster-yellows) hervor:

Pfropfreiser *A. a.*-Exemplare hatten bei Tomaten ähnliche Erscheinungen zur Folge.

Pfropfreiser hexenbesenförmiger Kartoffelpflanzen, die auf *Anagallis linifolia* aufgepfropft wurden, bewirkten an dieser Pflanze nur kleinere und blasser gefärbte Blütenkronen.

8. Zu einer Reproduktion des Virus kommt es — gemäss Versuchen auf Grund eines Aufpfropfen kranker Pfropfreiser auf gesunde Unterlagen von *A. a.* in der Zeit vom Beginne II. bis Ende III. — wenn die Tageslänge mindestens $12\frac{1}{2}$ bis 13 Stunden erreicht. Das Virus folgt auf diese Weise der Erhöhung der Eiweissbildung in der Phase der Vorbereitung der Wirtspflanze zum Blühen. Das winterliche Absinken der Menge des Virus in der Pflanze

kann habituell bis zum Nullpunkte (bis zum Verschwinden) des Spiegels führen. (Auch bei Löwenzahn, Kartoffelknollen, *Cynanchum vincetoxicum* und *Convolvulus arvensis*.) Unbedeutend ist dies Schwanken bei *Stellaria media*, welche bereits blüht, wenn die Tageslänge acht einhalb Stunden überschritten hat.

9. Die zikadophilen Viren sind vollkommen an die tierischen Wirtsorganismen angepasst, sie sind in ihnen persistent, häufig transovarial übertragbar, oft von langer Cellationsdauer und auf Pflanzen mechanisch nicht übertragbar). An ihre pflanzlichen Wirtsorganismen sind sie jedoch nicht so eng angepasst, (sie schaden ihnen, sind in ihnen mechanisch nicht übertragbar, der Spiegel ihrer Menge schwankt stark und ist von der ontogenetischen Entwicklung und vom Photoperiodismus der Pflanze abhängig).

Man kann darum die zikadophilen Viren dieser Gruppe als ursprünglich animale Viren ansehen, welche erst später auf Pflanzen übergegangen und so zu amphibischen Viren geworden sind.

Einleitung

Wir hielten ursprünglich (BLATTNÝ 1957) *Anagallis arvensis* L. (weiter *A. a.*) für eine weniger geeignete Versuchspflanze. Heute sehen wir sie jedoch bereits als geeigneter an: ihre Keimfähigkeit ist gering, aber man kann gesunde und kranke Pflanzen leicht vegetativ mittels Schnittstücken im Glashause in Gartenerde vermisch mit Sand nach dem Zerschneiden im Halbschatten vermehren. Die Schnittstücke treiben im Wasser Wurzeln und es ist möglich, sogar mit Wurzeln reich bewachsene Schnittstücke einzusetzen. Die Vermehrung der in den Boden gesenkten Schnittstücke ist erfolgreich. Wurzeln werden bei Pflanzen, deren Stengel in den Boden gesenkt worden sind, wie auch bei denen, die auf feuchtem Torfe liegen, hauptsächlich aus den Knoten, in geringerem Masse auch aus den Internodien herausgetrieben (HEGI 1908 bis 1931). Gesunde Schnittstücke lassen gesunde Pflanzen, erkrankte kranke Pflanzen entstehen.

Für vegetative Annäherungen verschiedener Art ist *A. a.* eine geeignete Pflanze. Die Technik dieser Versuche hat die Assistentin Z. PROCHÁZKOVÁ ausgearbeitet.

Material, Methoden und Ergebnisse

Wir verwendeten — es handelte sich um Glashausversuche — *A. a.*-Exemplare, die in der Form von Blütenkronenreduktionen typische Krankheitszeichen aufwiesen und aus unserem Garten in Praha-Dejvice, Na Karlovce stammten.

A. Pfropfung kranken *A. a.*-Materials auf gesunde *A. a.* „auf die Flasche“.

Am 4. IV. 1958 wurden zehn kranke *A. a.* auf gesunde *A. a.*-Exemplare „auf die Flasche“ gepfropft (HELLEBRANT 1958). Am 6. V. 1958 neun Unterlagenpflanzen mit verschmälerten

Hochblättern, die fast lineal, faltig und asymmetrisch sind. Am 17. V. 1958 — die Pfropfreiser leben, auch wenn sie nicht im Wasser sind, entweder, weil sie mit der Unterlage verwachsen, oder mit der Schnittfläche Nährstoff und Wasser aus der Unterlage empfangen.

Am 20. V. 1958 — bei den Unterlagen treten fransenförmige Blüten mit vier Kronenpetalen in Erscheinung und eine Pflanze hat rosa angehauchte Blätter (10. VI. 1958). Im weiteren Verlauf treten fransige, kleine, ausgeblasste und unregelmässige Blumenkronen auf.

Am 8. VII. 1958 werden rosa gefärbte Blattränder und Blüten mit gänzlich reduzierten Kronen festgestellt. Die Knospen öffnen sich bereits in den Scheitelteilen der Kelche, wenn sie noch sehr klein sind. Die Inkubationsdauer ist kurz — an den Blättern treten die ersten Symptome acht bis zehn Tage nach der Pfropfung auf.

B. Pfropfung kranker *A. a.*-Exemplare auf gesunde *A. a.* „übers Kreuz“ auf die „Flasche“

Das Pfropfreis wird in die Längsöffnung des Stengels der Unterlage so eingeführt, dass die Leitungsgewebe (Leitbündel) des Pfropfreises nach der Entfernung des Oberflächenteiles in Verbindung mit den freigelegten Leitungsgeweben des Stengels (der Unterlage) stehen (BLATTNÝ 1958b).

Am 11. IV. 58 zehn kranke *A. a.*-Exemplare auf gesunde *A. a.* gepfropft. Am 21. IV. 58 sind bei einer Pflanze zwei sich öffnende Knospen ohne Kronen. Bis zum 8. VII. 58 treten an den stark herangewachsenen Pfropfreisern weitere stark fransige Blütenformen in Erscheinung, die Blätter sind stark verändert und bei vier Pflanzen rosa gefärbt. Für diese Versuche hat eine solche Methode einen geringen Wert, ist jedoch für andere Pflanzenarten brauchbar.

C. Vom Blühen und der Reproduktion des Virus bei *A. a.*-Pflanzen.

a) Die Blüten gesunder Pflanzen öffnen sich nur in unmittelbarem Sonnenlichte gewöhnlich nicht früher als um neun Uhr und schliessen sich nach fünfzehn Uhr. Die Blütenkrone fällt nach einigen Tagen ab und nach dem Abfallen senkt sich die Blüte mit der sich entwickelnden Samenkapsel nach unten.

Die fransenförmigen Blüten der kranken Pflanzen schliessen sich bei Nacht und halten an der Pflanze um ein bis zwei Tage länger aus. Nach dem Abblühen entwickelt sich die Samenkapsel nicht weiter. Blüten mit mehr oder minder reduzierten Blütenkronen bleiben Tag und Nacht geöffnet, ihre Krone fällt nicht ab, sondern bleibt dauernd an der Pflanze (beispielsweise von Juni bis Oktober), die Blüte senkt sich nicht herab, die „Samenkapsel“ vergrössert sich manchmal stark, aber bleibt ohne Samen oder nur mit geringfügigen Rudimenten nicht entwickelter Samen.

b) In der Natur finden sich bei uns die ersten Blüten von *A. a.* Anfang Mai, die letzten Mitte Oktober. Gesunde und auch kranke *A. a.*, die im Glashause gezogen werden, beginnen im Frühjahr zu blühen, wenn die Tageslänge wenigstens 12½, häufiger noch 13 Stunden überschritten hat.

Die ersten Blüten pflegen bei leichter erkrankten Pflanzen normal zu sein, die weiteren zeigen Fransenform, noch weitere manchmal völlig reduzierte Blütenkronen. Pflanzen, die schwer erkrankt sind, zeigen schon an den ersten Blüten reduzierte Blütenkronen oder blühen überhaupt nicht. Bei den leichter erkrankten handelte es sich um maskierte Symptome. Solch eine Maskierung zeugt von latenten Formen dieser Virose. Eine Latenz des Virus bei *A. a.*-Pflanzen ist auch aus dem Versuche in Praha-Břevnov (2.—13. VIII. 1957) ersichtlich. Im Garten fanden sich hier zehn anscheinend gesunde *A. a.*-Exemplare vor, weiter zwei *A. a.*-Pflanzen, die sich an allen Trieben schwer erkrankt zeigten, sowie weiter eine *A. a.* mit einem typisch erkrankten Trieb, während die übrigen gesund schienen — das weist auf Akropetale des Virus und auf sein langsames Vordringen in alle Pflanzenteile, bzw. auf seine Latenz hin. Die zehn habituell gesunden *A. a.*-Exemplare wurden abgeschnitten. Nach elf Tagen entwickelte eine der Pflanzen an ihren unteren Teilen kranke Blüten, sie war also latent krank. Die übrigen blühten normal.

Vom Virusspiegel in der Pflanze, der im Winter niedrig ist und sich später erhöht, zeugen die Versuche in den Jahren 1957 und 1958. Im Jahre 1957 erkrankte von 20 gesunden *A. a.*-Pflanzen, auf die in den ersten Februar Tagen Gipfel erkrankter *A. a.*-Stengel gepfropft worden waren, ein Exemplar unter 20 nicht, während die Pflanzen in einigen anderen Fällen erst in den Sommermonaten erkrankten. *A. a.*-Exemplare, die im Mai und Juni gepfropft wurden, erkrankten immer typisch und nach kurzer Zeit, ja selbst nach weniger als 28 Tagen.

Gepfropft	Stand	Stand	Stand	Stand	Bemerkung
7. II. 58	21. IV. 58 Drei Pflanzen mit normalen Blüten, sieben an Stengelteilen mit pathologischen Blüten.	3. V. 58 Stand wie 21. IV.	17. V. 58 Alle zehn Pflanzen mit pathologischen Blüten.	9. VII. 58 Acht Pflanzen mit reduzierten zwei Pflanzen mit fransenförmigen Kronen.	Die ersten Blüten in der Regel normal. Aus den ersten normalen Blüten haben sich Kapseln mit Samen entwickelt. Inkubationsdauer 72 bis 99 Tage, Durchschnitt 85,5 Tage
28. II. 58	26. IV. 58 Sechs Pflanzen mit normalen Blüten, vier mit pathologischen Blüten.	3. V. 58 Stand wie 26. IV.	17. V. 58 Alle zehn Pflanzen mit pathologischen Blüten.	9. VII. 58 Acht Pflanzen mit reduzierten Blütenkronen. Zwei Pflanzen mit fransenförmigen Blütenkronen.	Die ersten Blüten etwa zu 40% normal. Aus den ersten normalen Blüten entwickeln sich Kapseln mit Samen. Inkubationsdauer 57—74 Tage, Durchschnitt 65,6 Tage.
25. III. 58	26. IV. 58 Vier Pflanzen mit normalen, sechs mit pathologischen Blüten.	3. V. 58 Stand wie 26. IV.	13. V. 58 Alle Pflanzen mit pathologischen Blüten.	9. VII. 58 Zehn Pflanzen mit reduzierten Blütenkronen.	Die ersten Blüten etwa zu 30% normal. Aus keiner Blüte haben sich Kapseln mit Samen entwickelt. Inkubationsdauer 32—49 Tage, Durchschnitt 40,5 Tage.

Im Jahre 1958 wurden in drei Serien immer zu je 10 Pflanzen kranke Pfropfreiser am 7. II., 28. II. und 25. III. in Spaltschlitze gesunder *A. a.*-Pflanzen gepfropft. Einige Pfropfreiser starben innerhalb von 17 Tagen ab, aber das hatte keinen Einfluss auf die Übertragung der Krankheit (Siehe Tabelle 1).

Aus dem Versuche geht hervor, a) dass die Inkubationsdauer bei einer nach der Tag- und Nachtgleiche vorgenommenen Pfropfung kürzer ist, als bei einer vor diesem Zeitpunkt durchgeführten,

b) dass eine theoretisch berechnete, durchschnittliche Inkubationsdauer nach Abrechnung der Intervalle zwischen den einzelnen Pfropfdaten etwa 40 Tage beträgt (das erste Intervall zwischen 7. II. 58 und 25. III. 58 misst 45 Tage, zwischen dem 28. II. 58 und 25. III. 58 25 Tage). Diese Inkubationsdauer entspricht der tatsächlich festgestellten durchschnittlichen Inkubationsfrist nach dem am 25. III. 58 durchgeführten Pfropfen,

c) dass die berechnete, kürzeste Inkubationsfrist nach Abrechnung der Intervalle zwischen dem Datum der Tag- und Nachtgleiche und dem Datum des Auftretens der ersten Krankheitssymptome nach dem Pfropfen am 7. II. und am 28. II. 31, bzw. 35 Tage beträgt und annähernd der tatsächlich erreichten aller kürzesten Inkubationsfrist von 32 Tagen nach dem am 25. III. durchgeführten Pfropfen entspricht.

Bis zur Tag- und Nachtgleiche beträgt die Reproduktion des Virus Null. Darum ist die Inkubationsdauer eigentlich praktisch gleich und man muss mit ihrem Beginne erst anlässlich einer intensiven Ansammlung des Virus rechnen, d. h. zur Zeit der Blühbereitschaft (rund um die Tag- und Nachtgleiche) bei einer Tageslänge von 12 und mehr Stunden.

Das alles weist auf das Schwanken des Virusspiegels im Körper des pflanzlichen Wirtsorganismus hin. Von diesem Schwanken zeugt auch die Entwicklung der ersten normalen, der folgenden fransenförmigen und dann erst der Blüten mit reduzierten Blütenkronen.

Dieses Schwanken des Virusspiegels wird auch dadurch erwiesen, dass Schnittstücke leicht erkrankter Pflanzen, die sich im Januar bis Anfang März einwurzelten, in der Regel die ersten Blüten normal, die späteren pathologisch entwickeln; Schnittstücke jedoch, die im April und Mai entnommen worden sind, also in einer Zeit der stärksten Virus-Reproduktion, haben gleich von Anfang an pathologische Blüten.

D. a) *A. a.* ist eine sehr konstante Art. In der Slowakei (Porubka bei Liptovský Hrádok) wächst eine Form mit kleineren, rostrot gefärbten Blumenkronen und von schwachem Wachstum.

b) Im Jahre 1956 fanden wir die ersten Symptome einer Erkrankung von *A. a.* bei uns Ende Juli; dieses Jahr konnte aber nicht massgebend sein, wir sind eben bis zu diesem Zeitpunkt auf diese Erkrankung von *A. a.* nicht aufmerksam geworden. Im Jahre 1957 am 12. VI. waren *A. a.*-Pflanzen in Südnähen noch normal. Die ersten Kennzeichen einer Erkrankung des Ackergauchheils traten in den allerwärmsten Lagen Ende Juni, in Südböhmen Anfang August in Erscheinung. Der Fund des Botanikers OPİZ, im Herbarium erhalten, stammt aus Studánka bei Čáslav in Böhmen vom 8. VI. 1817. Es handelt sich um eine voll erwachsene Pflanze mit zahlreichen Samenkapseln an den unteren Teilen des Stengels, wenigstens 3 - 4 Monate alt.

Um was für eine Pflanze handelte es sich nun (im Hinblick auf die Durabilität des Virus (BLATTNÝ 1958a), das diese Erkrankung des Gauchheil-exemplares verursachte? Nun, entweder um eine *Anagallis*, die in jenem sehr frühen und warmen Frühlinge bald aufging und vom Virus angesteckt worden ist. Der Ackergauchheil ist aber eine Pflanze, die fürs Blühen einen mindestens zwölfstündigen Tag fordert. Die angegebene Pflanze hatte also keine Zeit, sich von Ende März bis Anfang Juni so mächtig zu entwickeln, soviel Blüten anzusetzen und Samenkapseln zu bilden. Zwergzikaden, die diese Krankheit übertragen, hätten sich sehr früh, bereits im April, zeigen müssen, damit die Pflanze so schwer hätte erkranken müssen. Darum gestatteten wir uns den Schluss, dass es sich um eine Pflanze handeln müsse, die schon im Vorjahre, das heisst also schon im Jahre 1816 infiziert worden sein musste. Da aber der Ackergauchheil bereits bei -5°C erfriert, hätte der Winter 1816/17 sehr mild sein müssen, wenn die Pflanze überwintern konnte.

Die Überlegung, nach welcher es sich bei OPİZ' Ackergauchheil um eine überwinternde, im Vorjahre infizierte Pflanze handelte, ist auf der Ontogenese diese *A. a.*-Exemplares und auf der Pathogenese ihrer Virose begründet. Sie wurde durch einen Bericht über den Temperaturverlauf des Zeitabschnittes X. 1816 bis VI. 1817 nach Aufzeichnungen der Staatlichen Hydrometeorologischen Anstalt im Prager Klementinum gestützt, das wir der Liebenswürdigkeit des meteorologischen Instituts verdanken. Der Winter 1816 -17 wird als sehr mild bezeichnet, der Frühling 1817 verhältnismässig kühl. Im Winter dauerten die nächtlichen Minima im

ganzen acht Tage, die niedrigsten Punkte waren -7 bis -8 , -9°C (in der Zeit vom 22. XI. 1816 bis zum 13. I. 1817). Sonst sanken die Frosttemperaturen nur wenig unter Null. Danach wuchs OPÍZ' viröse *A. a.* auf einem mikroklimatisch günstigen Standorte, auf dem die Temperaturminima -5°C nicht erreichten, es handelte sich also in der Tat um eine überwinternde im Jahre 1816, also in einem Jahr, das ihrem Funde vorausging, infizierte Pflanze. In der Literatur (WEHSARG in KORSKO 1930) ist der Ackergauchheil als einjährige, wie auch als überjährige Pflanze angegeben. Der Terminus technicus „überjährig“ entspricht unserem Begriffe überwinternd und kann nur dort in Frage kommen, wo es keine tieferen Fröste gibt.

c) Die Samenbildung der *A. a.*-Exemplare, welche in ihren Gipfelpartien erkrankt sind und in ihren unteren Teilen Kapseln entwickelten, ist geringfügig. Die Virose kann die Frequenz von *A. a.* beeinflussen. Auf der Lokalität in Praha-Dejvice (BLATTNÝ 1957) erkrankte *A. a.* im Jahre 1956 zu 100%. Wir haben an diesem Standorte weder im Jahre 1957 noch im Jahre 1958 überhaupt *A. a.* gefunden. Es war dies eine Folge davon, dass die schwer erkrankten Exemplare an diesem Standorte im Jahre 1956 keine Samen, oder doch wenigstens keine keimfähigen Samen gebildet hatten. Diese Virose wird, wie schon früher festgestellt worden ist, nicht durch Samen übertragen. Ähnliches gilt auch von *Stellaria media* (L.) VILL.

d) In Žišov bei Veselí n/L. finden sich am 1. VIII. 1957 in Kartoffelbeständen nur sehr wenig *A. a.*-Exemplare, junge, durchweg gesunde Pflanzen. Ältere *A. a.*-Exemplare zeigen sich im Kornstoppelfeld in der Nachbarschaft des Rains schwer, weiter in das Feld hinein allmählich schwächer an dieser Virose erkrankt, was von einem allmählichen Vordringen der virenübertragenden Zwergzikaden vom Rainbewuchs aus, in welchem sie überwinterten, spricht.

e) Ein schwer erkranktes *Stellaria-media*-Exemplar, eine alte Pflanze, gefunden am 1. VIII. 1957 in Žišov. Entweder handelte es sich um eine überwinternde Pflanze, oder um eine sehr frühzeitige Infektion aus dem Frühjahr 1957. Junge *Stellaria media*-Exemplare waren zu dieser Zeit an diesem Standorte alle gesund.

f) Velvarsko — 9. VIII. 1957. Junge *A. a.*-Exemplare in Kornfeldern, blaue und rote Form, alle gesund.

g) Velvarsko, 9. VIII. 1957. In Kartoffelbeständen mit purple-top, yellow-top junge *A. a.* habituell gesund. Es handelte sich um eine Periode, die einer Periode grosser Hitzten Ende Juni und im ersten Drittel des Juli folgte. Es ist auch möglich, dass es sich im Falle f) und g) um tatsächlich gesunde *A. a.* handelte, weil die Zwergzikaden, die das Virus auf diese jungen *A. a.* hätten übertragen können (die Pflanzen waren Anfang August um ein Geringes älter als einen Monat, ein Virus enthalten konnten, das infolge der übergrossen Hitze inaktiviert war.

h) Velvarsko, 9. VIII. 1957. In Bříza auf einem unbestellten Grundstück neben zahlreichen schwer unter Symptomen von Stolbur erkrankten Ackerwindenexemplaren befindet sich eine Menge alter, im Frühjahr aufgegangener *A. a.*-Pflanzen, fast hundertprozentig an typischer Vergilbung erkrankt, eine grosse Menge nahezu 100% viröser *Veronica chamaedrys*, verkümmert ohne Blütenkronenanlage, ja ohne Blüten, die Vegetationspunkte manchmal anthokyanisiert, manchmal die Blütenkronen weisslich bis grün, manchmal der Hauptstengel normal und die unteren, später ausschlagenden Stengel krank (was man auch bei *A. a.* kennt). In der Nachbarschaft im Kartoffelbestand finden sich 3% an purple-top und yellow-top erkrankte Pflanzen. Die Zikadofauna übermässig zahlreich, mit sehr vielen *Calligypona pellucida* und *Macrosteles laevis*.

i) 1. X. 1957. Im Bezirke Třeboň in Spolí, Mladošovice und Slabošovice finden sich die Kartoffeln durchweg ohne yellow-top und purple-top. *A. a.*, *Stellaria media* und *Veronica sp.* in ihren Beständen gesund.

j) *Stellaria media* konserviert diese Virose von Jahr zu Jahr. So findet sich z. B. am 27. V. 1957 in Česká Budějovice eine Menge kranker Pflanzen dieser Art, die schon im Oktober 1956 erkrankt waren. Ähnlich war es von Herbst 1957 bis zum Sommer 1958.

k) In Praha-Dejvice, Na Karlovce fand sich eine typische, an Stolbur verkümmerte Ackerwinde unter kranken *A. a.* Aber weder auf dieser Pflanze, noch auf den benachbarten Parzellen fand sich *Hyalesthes obsoletus* Sign. Es handelte sich hier also um einen anderen Überträger, so wie in den Gebirgslagen der Slowakei. In Český Krumlov wurden wenige atypische Exemplare von *Convolvulus arvensis* gefunden, ferner, eine typisch verkümmerte Pflanze und eine Pflanze mit verkümmelter Blütenkrone und hypertrophischem Kelche. Stolbur kommt hier nicht vor und Vergilbungen sind äusserst selten.

l) In der Nähe von stolburkranken Ackerwinden (Dol. Loděnice, Ivánka, Bratislava, Ústí n. L., Břevnov, Dejvice, Českobudějovicko) sind *A. a.*, *Stellaria media*, *Veronica sp.* häufig an Ver-

gilbungen erkrankt ohne Rücksicht aus das Vorkommen oder Nichtvorkommen von klassischem Stolbur am Standorte an Tomaten und Kartoffeln und ob die Zwergzikade *Hyalesthes obsoletus* Sign. am Standorte unmittelbar, oder im weiteren Gebiet lebt.

E. Zur Pathogenese der Virose bei *A. a.*

a) Kranke *A. a.* proliferieren: Aus den pathologischen Blüten — aus den „Kapseln“ und auch ausserhalb wachsen Achsen mit Blättchen, allenfalls Blüten mit verkümmerten Blütenkronen. Wie im Freien, so im Glashause entstehen diese Prolifikationen nicht früher, als im IX. und Anfang X. Sie entstehen nicht im Frühjahr und nicht im Sommer. Am stärksten äussern sie sich im X. und XI. Monat. Im XII. Monat kommt es zu keinen Prolifikationen. Bis zu Anfang X., wenn die Tageslänge noch nicht sehr weit von 12 Stunden entfernt ist, sind sie „blütenmässig“, d. h. dass aus anomalen Blüten wieder anomale Blüten proliferieren; von Ende X. an, XI., sind es nur Blattprolifikationen, d. h. dass aus anomalen Blüten nur Stengel und Blätter proliferieren. Danach ist die Beziehung der Entwicklung anomaler Blüten und Prolifikationen zur Photoperiodizität den normalen Blüten analog. Prolifikationen muss man als „vegetative Formen“ der Vermehrung ansehen, was sich auch leicht aus der Tatsache beweisen lässt, dass „Setzlinge“, die durch Prolifikationen im Blütenstand des Porreelauchs entstanden sind, der an Vergilbung erkrankt war, sowie Prolifikate von *A. a.* leicht Wurzel fassen.

b) Im Glashause entwickeln sich ausnahmsweise (etwa zu einem Promille) bei gesunden Pflanzen Knospen, welche keine Blütenkronen, aber normale Kapseln mit Samen entwickeln. Es handelt sich um verspätet angelegte Knospen an den unteren Stengelpartien, die sich von Januar bis Februar zu Blüten entwickelt haben.

c) Die Fransenförmigkeit bei *A. a.* ist ein Kennzeichen, das bei Erkrankung das erste zu sein pflegt, sich aber nicht immer zeigen muss. Manchmal geht diesen Symptomen eine Verkleinerung und ein Blasswerden der Blütenkronen voraus. Die Fransigkeit kann sich als leichte Zähnung der Kronenpetalen am Rande, bis zu tiefer Zerspaltung äussern. Sie tritt sowohl bei den überwinterten *A. a.*-Pflanzen auf, die Wurzeln gefasst haben, oder aus Schnittstücken gezogen worden sind, als auch nach Propfung oder Übertragung durch Zwergzikaden. Zu einer Blütenkronenreduktion kommt es (ohne Erscheinung der Fransigkeit) bei schwer kranken *A. a.*-Pflanzen. Bei sehr schwer, Jahre hindurch kranken *A. a.*-Pflanzen entwickeln sich überhaupt keine Blüten mehr, sondern an ihrer Stelle nur beblätterte Stengel oder Blattrosetten.

Glashauspflanzen *A. a.*, die im Vorjahre erkrankt sind, beginnen Ende April und hauptsächlich Anfang Mai zu blühen. Sie pflegen die ersten Blüten normal zu entwickeln, oder es sind ihre Kronen an den äusseren Rändern gezähnt oder fransig und erst die Kronen der weiteren Blüten sind reduziert.

Fransige Blütenkronen treten auch bei nicht virösen *A. a.*-Pflanzen auf, die an einer chronischen bakteriellen Bräunung der Stengelbasis erkrankt sind. Das zeigt sich auch bei *Stellaria media* (L.) VILL. Es ist dies eine Glashauskrankheit, die wir im Terrain nur vereinzelt gesehen haben. Bei Pflanzen, die im Glashaus erkrankt und ins Freie ausgesetzt worden sind, schritt die Erkrankung weiter fort und endete durch ein vorzeitiges Eingehen der Pflanze.

Ausnahmsweise und zwar im Glashause haben wir fransige Kronen auch bei nicht virösen und sonst gesunden, aber geschwächten Pflanzen beobachtet. Es handelt sich also bei der Fransigkeit der Blüten um kein Symptom, das für Virose spezifisch ist. Fransigkeit der Blüten kann entweder ein Virus, oder auch ein intoxicierender Stoff anderen Ursprungs hervorrufen, wofür auch die Fransigkeit sprechen würde, die durch vegetative Annäherung phylogenetisch entfernter Pflanzen hervorgerufen worden ist, wie beispielsweise eine vorübergehende Fransigkeit der Blütenkronen von *A. a.*, die auf fadenförmige Keimtriebe von Kartoffeln gepfropft worden sind.

Zu einem lebhaften Stoffwechsel zwischen Pfropfreis und Unterlage kommt es auch bei phylogenetisch entfernten Pflanzen selbst dann, wenn es nicht zur Verwachsung zwischen Pfropfreis und Unterlage gekommen ist, sondern das Pfropfreis Wurzeln in die Unterlage getrieben hat, oder mit seinen lebenden Leitungsgeweben längere Zeit mit denen der Unterlage in enger Berührung stand.

Die Übereinstimmung dieses Symptoms, d. i. der Fransigkeit der Kronen weist auf die Notwendigkeit hin, die Pathophysiologie gründlicher zu studieren und vor allem die Einflüsse von Stoffen, die für die Pflanze toxisch sind und deren Entstehung entweder durch die An-

wesenheit eines Virus oder durch bakterielle Metaboliten eingeleitet worden ist, oder durch Stoffe, die aus der fremden Unterlage oder dem Pfropfreis in die Pflanze eingedrungen sind.

Die Zweigbildung von *A. a.* und *Stellaria media*, die schwer an Vergilbung erkrankt sind, ist reich. Bei ihr möchten wir im Hinblick auf die gleichzeitige Wuchsverkümmern der Stengel diese Art von „Hexenbesigkeit“ lieber „Moosförmigkeit“ nennen. Noch vor der Blüte tritt bei virösen *A. a.* manchmal eine Verengung, ein Welligwerden und eine Anhäufung von Gipfelblättern auf.

Beim Pfropfen von *A. a.* auf fadenförmige Keimtriebe der Kartoffeln kommt es bei *A. a.* zu einer Ungleichförmigkeit der Blätter, deren Ränder ungerade sind. Bei *A. a.*-Pflanzen, die vom letzten Drittel des Augusts an in der Natur und bei Glashauspflanzen, die schon vom Vorjahre her an Virose schwer erkrankt sind, pflegen manchmal die unteren (selten alle) Blätter schon im Frühjahr und im Sommer an den Rändern und auch völlig rosa bis rot gefärbt zu sein.

Weder diese Anthokyanisierung, noch die Deformierung der Blätter sind für Virose spezifisch, auch wenn beide Symptome bei virösen Pflanzen häufig sind. Wir kennen sie jedoch auch beim bakteriellen Braunwerden der Stengel und selten auch bei nicht virösen, habituell gesunden Pflanzen.

A. Versuch kranke *A. a.* auf verschiedene Pflanzen zu pfropfen und umgekehrt.

a) Pfropfreiser kranker *A. a.*; Unterlagen sind gesunde *Anagallis linifolia* L.

Am 12. V. 1928. 20 Pflanzen in Spaltschlitz gepfropft. Bis zum 21. VI. 1958 blieben nur 5 Pflanzen am Leben und nur an zwei von ihnen die kranken Pfropfreiser lebend. Anfang Juli zeigten sich bei *Anagallis linifolia* kleinere und blässere Kronen, jedoch keine weiteren Anzeichen. Nach Beobachtungen in der Natur ist *Anagallis linifolia* gegen Infektionen durch Viren aus der Gruppe der Akarpien empfindlich. In unserem Falle wiesen die schwachen Anzeichen, die sich bei einem kleinen Teile der Pflanzen zeigten, wahrscheinlich auf eine ungenügende Menge des Virus hin.

b) Pfropfreiser kranker *A. a.*, Unterlagen gesunder *Nicotiana glutinosa* L.

Im Mai 1957 wurden 10 Pflanzen in den Spaltschlitz gepfropft. Neun Pfropfreiser gingen innerhalb von vier Tagen ein, ein Pfropfreis lebte 10 Tage. 9 Pflanzen *N. glutinosa* blieben ohne Symptome und entwickelten normale Blüten. Die einzige Pflanze, die im Jahre 1957 keine Blütenanlagen bildete, begann am 22. 9. 1958 normal zu blühen. Am 22. V. 1958 wurde die Pfropfung wiederholt. 10 Pflanzen. Am 2. VI. 58 lebten nur noch vier Pfropfreiser. Bei 4 Pflanzen *N. glutinosa* zeigten einige Blätter gewellte Endteile der Spreite. Bis Ende 1958 blühten die Pflanzen normal und bei den übrigen 7 entwickelten sich die Blütenanlagen bis zu dieser Zeit keineswegs. Normal blühten sie im April 1959.

Das Virus ist nicht übertragen worden, wahrscheinlich infolge der toxischen Wirksamkeit der Unterlage von *N. glutinosa* auf die Propfreiser von *A. a.* und infolge des ausserordentlich frühzeitigen Absterbens dieser Pfropfreiser.

c) Kranke *A. a.* in den Spaltschlitz gesunder Kartoffelsämlinge gepfropft.

6. V. 58, 20 Pfropfreiser auf 20 Sämlingen, die Pfropfreiser lebten mindestens 20 Tage und wuchsen. 12. VII. 58 — Diese Sämlinge haben kleine, ungeteilte Blätter, lange und dünne Triebe, einer von ihnen ist ein typisches yellow-top-Exemplar. Am 18. VIII. 58 haben zwei Kartoffelsämlinge typischen yellow-top. Am 30. 8. 58 entwickelte sich bei 9 Sämlingen eine Menge oberrirdischer Knollen, die auch neu zu keimen begannen. Bei der Ernte (XI. 1958) war ein Fünftel der Knollen weichgeworden, ein Drittel der Knollen entwickelt fadenförmige Keime.

Die Pfropfreiser der kranken *A. a.* übertrugen bei diesem Versuche an einem grossen Anteil der Kartoffeln drei Krankheitserscheinungen: Entwicklung langer, dünner Stengel mit ungeteilten Blättern, zu kleinem Teile typischen yellow-top, die Bildung zahlreicher oberirdischer Knollen, von denen ein Teil weich war und ein Teil noch in demselben Jahre im Herbst fadenförmige Keime trieb.

d) Keimtriebe aus Knollen, die Pflanzen entstammen, auf welche im Vorjahre wie auf Sämlinge kranke *A. a.* aufgefropft wurden.

16. V. 1957 wurden 20 kranke *A. a.* in Spaltschlitz gesunder Sämlinge gepfropft. Drei Sämlinge hatten ungeteilte Blätter, von ihnen hatte Pflanze Nr. 16 Knollen, von denen vier je einen und eine Knolle zwei Fadenkeime, eine weitere Knolle gesunde Keime hatte. Pflanze Nr. 3 hatte eine Knolle ohne Keime. Die Knollen wurden im Frühjahr 1958 ausgesetzt. Am 19. IV.

1958 wurden die Triebe aus diesen Keimen auf 20 junge Tomaten gepfropft. Bei 6 Pfropfreisern (Kartoffeln) blieben die Blätter ähnlich den Glashauspflanzen der zweiten Generation, die von der Hexenbesenkrankheit befallen waren, ungeteilt. Bei 3 Kartoffelpfropfreisern wurde je eine oberirdische Knolle mit einem grünen, beblätterten Triebe gebildet, so wie es bei der Glashaushausform der Hexenbesenkrankheit der Kartoffeln zu sein pflegt. Von den Tomaten verzweigten sich drei Pflanzen stark und wachsen wenig.

Am 13. V. 58 wurden 5 gesunde *A. a.* auf 5 fadenförmige Kartoffeltriebe aus dieser Gruppe aufgefropft. Am 23. VI. 58 weisen *A. a.* unregelmässig verschmälerte und durchgebogene Blätter und zwei dieser Pflanzen fransige Kronen auf. In der Folgezeit kam es zu keiner Blütenkronenreduktion und der grösste Teil der Blüten war normal.

Kranke *A. a.* auf gesunde Sämlinge von Kartoffeln gepfropft bewirkten also zu kleinem Teile, dass sich ihre Blätter nicht teilten und die Knollen Fadentriebe bildeten. Die Triebe aus diesen Keimen hatten, aufgefropft auf Tomaten, auch weiterhin ungeteilte Blätter und bildeten schon im Herbst Knollen, die von Neuem ausschlugen. Die Keime dieser Knollen, auf Tomaten gepfropft, riefen schwaches Wachstum und starke Verzweigung hervor. Bei gesunden *A. a.* aufgefropft auf Fadenkeime dieser Kartoffeln, bildeten sich unregelmässig verschmälerte und durchgebogene Blätter. Manche Blüten waren fransig, der grösste Teil normal und es kam zu keiner Reduktion der Kronen.

e) Kranke *A. a.* gepfropft auf Tomaten.

Am 4. IV. 58. 10 *A. a.* auf 10 Tomaten (mit zwei Paaren rechter Blätter). Drei Pfropfreiser starben bis zum 26. IV. 58 ab. Am 17. V. 58 verzweigten sich zwei Tomatenpflanzen stark, 7 Pfropfreiser der Ackergauchheilpflanzen leben und wachsen. 5. VI. 58 — zeigen vier Tomatenpflanzen schlanken Wuchs, verkleinerte Fiederblättchen der Gipfelblätter; diesen Pflanzen fallen im Juli die Knospen ab oder werden grösstenteils überhaupt nicht angelegt. Eine Pflanze hat eine verkümmerte Blüte mit einer grünlichen Blütenkrone.

Die Pfropfreiser der kranken *A. a.* riefen bei den Tomaten in ziemlich grossem Anteil einen abnormal schlanken Wuchs und eine starke Verzweigung, Verkümmern der Anlage oder Abortierung der Knospen, sowie Verkümmern und Grünwerden der Kronen, also sogenannten pseudoklassischen Stolbur hervor (BLATTNÝ 1958b).

f) Fadenkeime der Kartoffeln, gepfropft auf gesunde *Anagallis linifolia*-Exemplare.

Am 12. V. 58 wurden zehn Kartoffel-Fadenkeime auf 10 *Anagallis linifolia*-Exemplare geimpft. Am 18. VII. 58 — zeigt eine Pflanze *A. linifolia* kleinere und blasser gefärbte Blüten. Später änderte sich dieser Stand nicht mehr.

Auf eine vegetative Annäherung der Fadenkeime der Kartoffeln reagiert, wie es scheint, *Anagallis linifolia* nur zu kleinem Anteil und nur durch eine blassere Färbung der Blüten.

g) Pfropfreiser hexenbesiger Kartoffeln, gepfropft auf gesunde *A. a.*-Exemplare in den Spaltschlitz.

Am 10. IV. 58 zehn Keimtriebe hexenbesiger Kartoffeln auf zehn gesunde *A. a.* gepfropft. Am 26. IV. 58 leben alle zehn Pfropfreiser. Am 3. V. 58 zeigen fünf *A. a.*-Exemplare starke Zweigbildung. Am 6. V. 58 wird festgestellt, dass die neu zugewachsenen Blätter von *A. a.* enger und gewellt sind. Eine *A. a.*-Pflanze hat leichtgezähnte Blütenkronen. Am 25. V. 58 haben zwei Blüten sechs Kronenpetalen, das überzählige Blättchen ist klein. Eine dieser Blüten zeigt starke Fransigkeit, die zweite hat gezähnte Blättchen. 26. V. 58 — wenig veränderte Blätter, zahlreiche Blüten haben typisch fransenförmige Kronen. Fransigkeit und zwar auch starke, folgt bei allen (übrigen) *A. a.*-Pflanzen in den weiteren Wochen.

h) Pfropfreiser hexenbesiger Kartoffeln, gepfropft auf *A. a.*-Pflanzen „auf die Flasche“.

Am 20. V. 1958 zehn Keimtriebe hexenbesiger Kartoffeln der zweiten Generation auf *A. a.*-Pflanzen. 3. VI. 58 — zwei Blüten von *A. a.* weisen stark fransige Blütenkronen auf; in den weiteren Tagen nimmt die Zahl der fransigen Kronen zu. 16. VI. 58 — Eine Blüte hat sechs Blütenkronenblätter. 21. VI. 58 — alle *A. a.*-Pflanzen haben stark fransige Blüten, drei Pflanzen typisch veränderte, in die Länge gezogene und gewellte Blätter. Zu einer Reduktion der Kronen kam es nicht.

Auf eine vegetative Annäherung an hexenbesige Kartoffeln (sensu VALENTA 1956; Ursprung der Kartoffeln Liptovský Hrádok 1957) reagieren die *A. a.*-Pflanzen mit einer Verschmälern und Durchbiegung der Blätter, sowie mit fransigen Blütenkronen, zu einem kleinen Teil auch mit einer Vermehrung der Kronenblätter (6 statt 5), jedoch nicht mit einer Reduktion der Kronen.

i) *A. a.*, in den Spaltschlitz auf Kartoffel-Fadenkeime gepfropft.

4. V. 58 zwanzig gesunde *A. a.*-Pflanzen auf Fadenkeime von Kartoffeln gepfropft (aus Knollen von purple-top und yellow-top-Pflanzen gewachsen, die 1957 Na Karlovce gezüchtet worden sind). 20. V. 58 — die Pfropfreiser *A. a.* leben und wachsen. 24. V. 58 — acht Pfropfreiser *A. a.* haben veränderte, hellere Blätter mit ungeraden Rändern. 23. VI. 58 — ein Pfropfreiser *A. a.* hat rosa angehauchte Ränder der unteren Blätter, die Blüte ist stark fransig. Bei drei weiteren Pfropfreisern von *A. a.* treten bis zum 22. VII. stark fransige Blüten in Erscheinung. Vom 23. VII. 58 wachsen und verzweigen sich die *A. a.* sehr stark. 6. VIII. 58 — Pfropfreiser von *A. a.* blühen ganz normal. Weder in dieser Zeit noch später zeigten sich fransige Kronen.

Nach der Entfernung der Gummiverbindungen wurde festgestellt, dass die Pfropfreiser von *A. a.* in die Kartoffelkeim-Unterlage Wurzeln getrieben hatten, der Keim dann abstarb und die Wurzeln durch die Reste des abgestorbenen Keimes hindurch in den Boden gewachsen waren. Vom Zeitpunkt dieses Geschehens an blühten sie normal.

Solange demnach also die *A. a.*-Pfropfreiser mit den Fadenkeimen der Kartoffeln — den Unterlagen verbunden waren, wirkte der intoxicierende Einfluss der Kartoffelkeime auf sie ein, jedoch nicht der Einfluss der Viren. Ein Fadenkeim selbst muss vielleicht gar nicht virös sein, sondern ist nur die Folge einer Virose. Wir bestätigten dies in einem Versuche des Jahres 1959, in dessen Verlauf wir fransenförmige Blüten auch bei *A. a.* erzielten, die auf gesunde Kartoffelkeime gepfropft worden waren.

j) Kartoffel-Fadenkeime, in den Spaltschlitz gesunder *A. a.*-Pflanzen gepfropft.

25. IV. 1953 — 20 Fadenkeime auf gesunde *A. a.* gepfropft. 2. V. 58 — dasselbe mit 20 Fadenkeimen auf *A. a.* wiederholt. 13. V. 58 — alle Kartoffelkeime sind lebend. Die Blätter von 7 *A. a.*-Pflanzen, 2. V. 58 gepfropft, welche neu gewachsen sind, sind schmal, schwach gefurcht und asymmetrisch, insbesondere die Blätter an den Trieben, die in der Nähe der Fadenkeime wachsen. Wenn es sich um eine Virose handelt, könnte man die Inkubationsfrist auf 12 Tage schätzen. 17. V. 58 — Bei den meisten Unterlagen haben die neugewachsenen Blätter dreieckige bis asymmetrische Formen. Dies ist bei Pflanzen nicht der Fall, bei denen das Pfropfreis frühzeitig einging. Die Knospen sind bei manchen Pflanzen verkümmert, öffnen sich vorzeitig oder fallen ab (abortieren). Bei einigen Pflanzen haben die allerjüngsten Blätter normale Gestalt, während die ein wenig älteren Blätter noch verchnälert sind. Vom 26. V. 58 an treten blässere, manchmal kleinere, leicht fransige Blüten auf, die Gipfelblätter sind bei manchen Pflanzen verschmälert. Die Fransigkeit der Kronen äussert sich in der Folgezeit sehr stark, alle Pflanzen haben stark fransige Blüten.

Durch Pfropfen von Fadenkeimen auf gesunde *A. a.* wurde Fransigkeit, jedoch keine Reduktion der Blütenkronen hervorgerufen. Eine Rehabilitation der Blätter äusserte sich nach anfänglicher Deformierung in der Annahme einer normalen Gestalt. Das liess auch die Auslegung zu, dass das Virus nach einer bestimmten Zeit aufgehört hat zu wirken, oder eher dass es sich nicht um eine Virose, sondern um eine vorübergehende Intoxikation handelte.

Die Verwendung normaler, gesunder Keime und auch Übertragungen anderer Art (hauptsächlich durch Zikaden, weil *Cuscuta* sp. wegen ihrer Unlust auf *A. a.* zu leben, sich kaum für diese Versuche eignet) können diese Fragen nötigerweise klären.

k) Fadenkeime von Kartoffeln auf gesunde *A. a.* „auf die Flasche“ gepfropft.

16. V. 58 — Zehn Kartoffel-Fadenkeime (gleicher Provenienz wie in den zwei vorhergegangenen Versuchen) auf gesunde *A. a.* gepfropft, 19. V. 58 wiederholt an 10 gesunden *A. a.* 5. VI. 58 — die Fadenkeime leben und wachsen. 27. V. 58 — bei *A. a.* aus der am 16. V. gepfropften Gruppe traten 3 Blüten mit kleinen Kronen in Erscheinung, von denen eine blässgefärbt ist. 2. VI. 58 — Bei *A. a.* aus der am 19. V. 58 gepfropften Gruppe zeigen sich manche Blätter in veränderter Gestalt und zwar knapp am Pfropfreis und wiederum an den Gipfelteilen. Einige Blüten sind blässer. 5. VI. 58 — bei zwei Pflanzen finden sich blasse und zwei fransige Blüten. In den weiteren Tagen treten gezähnte Blüten auf, die an den Kronenblättern zugespitzt und fransig sind. Vom 10. VI. 58 an haben acht Pflanzen stark fransige Blüten. In der Folgezeit änderte sich der Stand nicht mehr.

Auch bei diesem Versuch trat nach vegetativer Annäherung das Symptom der Fransigkeit der Kronen in Erscheinung. Die vegetative Annäherung zeigte sich dauerhaft. Auch dieses Symptom blieb stabil.

Diskussion

A. Zum Schwanken des Virusspiegels in der Wirtspflanze.

Das Virus beeinflusst die Photoperiodizität von *A. a.* allerdings auf keinerlei Weise. Diese Beobachtung (auch wenn einer solchen Beziehung bisher nur wenig spezielle Aufmerksamkeit gewidmet worden ist) stimmt auch mit anderen Beobachtungen an pflanzlichen Virose überein (BANCROFT 1958, CHEO, POUND 1952).

Da das Virus ein metabolischer Bestandteil des Metabolismus der Wirtspflanze ist, kann es auch keine ähnlich entscheidende Aufgabe haben.

Das Schwanken des Spiegels der Viren dieser Gruppe in der Wirtspflanze hängt von der ontogenetischen Entwicklung der Pflanze ab, die auch durch die Photoperiodizität des Wirtsorganismus bestimmt wird. Vom Jahre 1953 an beobachten wir in Praha-Dejvice, Na Karlovce den Gesundheitszustand von 15 Exemplaren *Taraxacum officinale* WEB., die aus Velká Lomnice in der Slowakei stammen und 1953 nach Prag übersetzt worden sind, sowie vom Jahre 1954 an eine Pflanze gleicher Art aus Malešice bei Prag. Diese Pflanzen zeigten sich 1953 bzw. 1954 schwer erkrankt mit Symptomen des europäischen aster-yellows (Grünwerden der Blüten, Gelben der Blätter, Hervortreten der Blattäderchen, Einrollen (bzw. Werfen entlang der Hauptader). Im Jahre 1954 traten diese Symptome vereinzelt auf, im Jahre 1955 blühte die Pflanze aus Malešice normal und hatte nur Symptome an den Blättern. In den weiteren Jahren milderten sich die Symptome weiter, im Jahre 1958 waren nur bei einer Pflanze aus Velká Lomnice zwei Blütenstände zottig, die Blätter hatten bei einer Pflanze mässig vortretende Äderchen, die übrigen Pflanzen dieses Standortes waren (sowie auch in den vorhergehenden drei Jahren) habituell gesund. Die Pflanze aus Malešice hatte vom Jahre 1955 bis zum Jahre 1958 keine Symptome. Im Jahre 1959 ging sie ein. Die Pflanzen aus Velká Lomnice zeigten Symptome des „Einrollens“ und rötlicher Blätter. Der Löwenzahn blüht bei uns, wenn die Tageslänge 13 bis 13½ Stunden erreicht hat. Es scheint, dass in der Zwischenzeit der Virusspiegel bei ihr nahezu bis zum völligen Verschwinden absank. Dieser Fall könnte auch bei vegetativer Annäherung mancher anderer Pflanzen, wie z. B. Kartoffeln eintreten und so wäre dann die geringfügige Übertragung von Stolbur oder ihr Fehlen (SUCHOV und VOVK, 1949) und verwandter Virose, wie z. B. von big-bud (NORRIS 1954; CONROY 1954) auf die durch Knollen entstandene Nachkommenschaft, sowie die geringe Stabilität solcher Übertragungen (MAC LEOD 1949) zu erklären. Ein weiterer Beweis ist das Verhalten des Virus aus *A. a.* in *Cynanchum vincetoxicum* (L.) PERS. Im Jahre 1957 haben wir auf diese Pflanze virös erkrankte *A. a.* gepfropft. Die Pfropfreiser blieben mindestens drei Wochen am Leben. Von fünf *Cynanchum*-Exemplaren äusserten zwei Pflanzen innerhalb von sechs Wochen Symptome einer schwachen Chlorose an verkümmerten Seitentrieben, während die Blütenanlagen abortierten. Im Jahre 1958 waren diese Pflanzen ganz ohne Symptome. *Cynanchum* blüht bei uns, wenn die Tageslänge 15 Stunden erreicht hat. Hierher gehört auch der seltene Fall einer habituellen Gesundung von *Convolvulus arvensis*-Exemplaren, die

unter Stolbursymptomen erkrankt sind, ferner eine habituelle Gesundung von *Cirsium arvense* L., die von uns in der Natur häufiger beobachtet worden ist.

Ob es hier zu einer faktischen Gesundung kommt, einem Absinken des aktiven Virus auf einen Null-Spiegel, können wir vorderhand noch nicht entscheiden. Dies wird erst nach der sicheren Feststellung von Viruspartikelehen in der Pflanze und auf Grund eindeutiger serologischer Teste möglich sein. Diese Regel vom starken Schwanken des Virusspiegels gilt nicht für alle Pflanzen: *Aquilegia vulgaris* L. blüht bei einer Tageslänge von ca 15 Stunden; im Vorjahre angesteckte Exemplare äusserten sich schon im letzten Drittel des Mai 1957 und auch 1958 als schwer erkrankt. (Praha-Dejvice, Dol.) Dasselbe gilt von *Delphinium elatum* L. Bei *Aquilegia* handelt es sich sehr oft um eine tötliche Erkrankung — die kranken Pflanzen gehen meist über den Winter ein.

Ein analoger Indikator der Anwesenheit von Viren der Gruppe der Samenlosigkeit (Akarpie-Stolbur und Vergilbungskrankheiten, BLATNÝ 1959) wie *A. a.* könnte auch *Stellaria media* (L.) VILL. sein. Die Anwesenheit viröser Individuen der letztgenannten Art in Pflanzenbeständen, die an Viroten des Komplexes der Samenlosigkeit erkrankt sind, ist manchmal häufiger, als die Anwesenheit von kranken *A. a.* Die Identität der Erkrankungen haben wir durch Pfropfung kranker *A. a.* auf gesunde *Stellaria media*-Exemplare im Jahre 1957 festgestellt. Die Pfropfreiser von *A. a.* im Februar und März hielten sich bis zu drei Wochen auf *Stellaria* lebend. Sie wuchsen nicht zusammen, aber sie trugen bei 5% (bei zwei von 40 Pflanzen) innerhalb von 8 Wochen die Erkrankung über, welche sich bei *Stellaria* in einem Kümern bis völligem Abortieren der Blütenkronen äussert. Bei *A. a.* kann man in den Wintermonaten von einer Art Latenz des Virus sprechen. Das ist bei *Stellaria* nicht der Fall. Diese Pflanze (KORSMO 1930) hat in der Natur im Jahre in der Regel zwei Generationen: eine Frühjahrsgeneration, die im Sommer Samen trägt und eine Herbstgeneration, die überwintert und vor allem im Frühjahr des nächsten Jahres Samen trägt. Diese Generation bleibt den ganzen Winter über auf gleiche Weise erkennbar krank wie in den Perioden der längeren Tage. Zur Entwicklung anomaler Blüten kommt es bei *Stellaria* schon in Zeiten, in denen die Tageslänge $8\frac{1}{2}$ Stunden überschreitet. Gesunde *Stellaria*-Exemplare blühen ebenfalls in einer Zeit, in der die Tageslänge $8\frac{1}{2}$ Stunden überschreitet. Der Habitus der Pflanzen verändert sich während des Winters nicht.

Offenbar hängt die Akkumulation des Virus mit diesen photoperiodischen und im Zusammenhang mit ihnen mit den ontogenetischen Zuständen und Beziehungen zusammen. Dies bestätigt so die These von der Florikolie und Akropetalie der Viren dieser Gruppe (BOJČANSKÝ, BLATNÝ, 1953). Die Maskierung von Viroten in den Vorfrühlings- und Frühlingsmonaten, von der wir bei *A. a.* Erwähnung getan haben, existiert bei *Stellaria media* nicht; gleich die ersten Blüten der überwinterten Pflanzen und der eingewurzelten Schnittstücke sind typisch pathologisch. Danach unterliegt die Menge der Viren im Pflanzenkörper der *Stellaria media* keinen so grossen Schwankungen, wie bei *A. a.*

Da *Stellaria media* Fröste von minus 25° C und wahrscheinlich mehr Grad verträgt, kann sie gleich nach dem Überwintern beim ersten Auftreten der Zikaden denselben Nahrung und auch das Virus vermitteln. *Calligypona pel-*

lucidus F. saugt an diesen Pflanzen gern. Die Keimfähigkeit der Samen beträgt in der Regel 100%, die Pflanzen gehen im Glashaus auch schon in einer Woche auf. Die Vogelmiere kann man in jedweder Jahreszeit vegetativ vermehren, ob nun durch Senkstücke (wobei es genügt, ein Stückchen Stengel auf den feuchten Boden zu legen), oder durch Schnittstücke, von gesunden oder kranken Pflanzen. Letztere haben verkümmerte, abnormal gestaltete, oder überhaupt reduzierte Blütenkronen; häufig sind die Kronen auch in Blätter umgewandelt oder die Kelche hypertrophiert; bei den schwer erkrankten Pflanzen werden überhaupt keine Blütenanlagen mehr gebildet. Es ist wahrscheinlich, dass auch Pflanzen, die als *Stellaria apetala* UCRIA pp. [*Stellaria media* subsp. *pallidus* (PIRE) ASCHERS et GREB.] (DOSTÁL 1950) bezeichnet werden, eigentlich viröse Pflanzen sind. Die kranken Blüten bilden manchmal Kapseln, aber ohne Samen, oder nur mit verkümmerten Samen, die nicht keimen. *Stellaria media* (L.) VILL. ist eine für Experimente geeignete, gefährliche Reservoirpflanze für Virosen dieser Gruppe.

B. Zur Symptomatologie der Virose bei *A. a.*

Es ist wahrscheinlich, dass die symptomatologisch identische oder fast gleiche Erkrankung von *A. a.* nicht durch eine einzige Virusart oder einen Stamm aus der Gruppe der Akarpien hervorgerufen wird, sondern dass es sich um mehrere Erreger oder um eine komplexe Erkrankung handelt. Einige Exemplare *A. a.*, die später durch pathologische Blüten die Krankheit äusserten, zeigten vordem verschmälerte bis linear deformierte Blätter, manchmal sogar nur als Kennzeichen der Winterperiode (bzw. Herbst- oder Vorfrühlingserscheinungen); andere *A. a.*-Pflanzen, die sich später an den Blüten typisch erkrankt erwiesen, zeigten normale Blattformen. (Manchmal treten ganz selten auch *A. a.*-Pflanzen auf, bei denen die Blattform verändert, verengt und gewellt ist, die Blüten jedoch normal sind. Wir können nicht entscheiden, ob es sich um eine genetische Ursache, oder um eine physiologische Störung handelt).

Beide Krankheitstypen (mit verschmälerten und normalen Blättern), haben wir versucht, durch Pfropfung zu übertragen, aber in manchen Fällen trat bei dieser Übertragung die andere Form der Erkrankung in Erscheinung, so dass man nicht sagen kann, dass es sich hier um zwei Stämme handelt. Eine Analogie besteht bei der Übertragung mit Hilfe von kranken Pfropfreisern auf Tomaten: Beim Pfropfen von Ackergauchheil- und Ackerwinden-Exemplaren erkranken die Tomaten an zwei Krankheitstypen, das eine Mal am Typus reduzierter, gelbender oder anthokyanisierter Fiederblättchen der Gipfelblätter, das andere Mal am überwuchernden Typus mit abnormaler Verzweigung (BLATTNÝ 1958b); der erste gehört in die unbestimmte Kategorie des pseudoklassischen Stolbur, der zweite in die ebensowenig bestimmte Kategorie der europäischen Vergilbungserkrankung der Tomaten. Für die Wahrscheinlichkeit der vorgebrachten Vermutungen sprechen auch die zwei Krankheitsformen, die von uns bei Kartoffelsämlingen nach einer Pfropfung mit kranker *A. a.* hervorgerufen worden sind: einfache Blätter und die Bildung von oberirdischen Knollen bei einigen Unterlagen, yellow-top bei anderen und die Bildung von Fadenkeimen bei beiden. Weiter zeigt sich auch die Über-

tragung des klassischen Stolbur durch die Zikade *Euscelis plebejus* auf *A. a.* (MUSIL und VALENTA 1958), an der sie eine typische Reduktion der Blütenkronen hervorrief, die von der Reduktion der Kronen bei Vergilbungserkrankungen (in Nicht-Stolbur-Gebieten) habituell nicht unterscheidbar ist.

C. Folgende Ansichten ergeben sich aus dem Bisherigen:

Die zikadophilen Viren waren ursprünglich animale Viren (MARAMOROSCH 1954). In Tieren prosperieren sie besser, als in Pflanzen, in denen sie vielleicht auch veränderlicher sind; in den Tieren sind sie persistent. Manche von ihnen vermehren sich in den Tieren und einige gehen schliesslich auch transovarial auf die Nachkommenschaft über. Ihre Cellationszeit in den Vektoren ist häufig lang. Auf die Pflanzen sind sie mechanisch nicht übertragbar. Später wurden diese Viren auch zu Viren in Pflanzen, denen sie nicht so angepasst sind und denen sie auch schwer schaden. Für die angeführte Vermutung spricht auch die Tatsache, dass der Spiegel der Viren dieser Gruppe in den Pflanzen beim Schwanken den Nullpunkt erreichen kann.

Literatur

- BANCROFT, J. B.: Temperature and temperature-light effects on the concentration of squash mosaic virus in leaves of growing cucurbits. — *Phytopathology* **48**: 98—102, 1958.
- BLATTNÝ, C.: Příspěvky k poznání virových žloutenek rostlin. I. Květní anomálie dřeňníčky rolní (*Anagallis arvensis* L.) [Beiträge zur Kenntnis viröser Vergilbungs-krankheiten der Pflanzen. I. Blütenanomalien des Ackergauchheils (*Anagallis arvensis* L.)]. — *Čs. biologie (Praha)* **6**: 250—265, 1957.
- BLATTNÝ, C.: Základní otázky stolburu. Stolbur a příbuzné vírusové bezsemennosti rostlin [Grundfragen der Stolburkrankheit. Stolbur und verwandte Virose der Samenlosigkeit der Pflanzen]. — p. p. 37—54, Bratislava 1958a.
- BLATTNÝ, C.: Zur Kenntnis des Umlaufes einiger Viren in der Natur. Vortrag, gehalten in R. A. W. Bucuresti, nicht publiziert, 1958b.
- BLATTNÝ, C.: *Anagallis arvensis* L. als Indikator der Anwesenheit von Viren aus der Gruppe der Samenlosigkeit (Akarpien) — Stolbur und Vergilbungs-krankheiten. — *Biol. Plant.* **1**: 211—222, 1959.
- BOJŇANSKÝ, V., BLATTNÝ, C.: Virózne žlteky a bezsemennosti vo svetle sovietskych a našich výskumov [Viröse Vergilbungs-krankheiten und Samenlosigkeit im Lichte der sovjetischen und heimischen Forschung]. — *Biológia (Bratislava)* **8**: 538—560, 1953.
- CONROY, R. Y.: Purple-top wilt of potato. — *New S. Wales Dept. agric. Sci. Bull.* **75**: 1—12, 1954.
- DOSTÁL, J.: Květena ČSR [Flora der Tschechosl. Republik]. — Praha 1950.
- HEG, G.: Illustrierte Flora von Mitteleuropa. I.—XIII. — München 1908—1931.
- HELEBRANT, L.: Příspěvek k poznání virových chorob maliníku a ostružiníku [Beitrag zur Kenntnis der Virus-Krankheiten des Him- und Brombeerstrauches]. — *Sborník ČSAZV, Rostlinná výroba* **4**: 599—620, 1958.
- Hydrometeorologisches Institut, Praha. Bericht über die Wetterverhältnisse in der Zeit vom 1. X. 1816—30. VI. 1817.
- CHEO, P. C., POUND, G. S.: Relation of air temperature, soil temperature, photoperiod an light intensity to the concentration of cucumber virus in spinach. — *Phytopathology* **42**: 306—310, 1952.
- KORSMO, E.: Unkräuter im Ackerbau der Neuzeit. — Berlin, 1930.
- MAC LEOD, D. J.: Some observations of the bunch-top (purple-top) disease in Canada. — *Amer. Potato J.* **26**: 95, 1949.

- MARAMOROSCH, K.: Biological transmission of plant viruses by animal vectors. — Transact. New York Acad. Sci. II., 16: 189—195, 1954.
- MUSIL, M., VALENTA, V.: Mündliche Mitteilung, 1958.
- NORRIS, D. O.: Purple-top wilt, a disease of potato caused by tomato big-bud virus. — Austral. J. agric. Res. 5: 1—8, 1954.
- SUCHOV, K. S., VOVK, A. M.: Stolbur paslenovych [Stolbur der Solanaceaeen]. — Moskva 1949.
- VALENTA, V.: Virus metlovitosti zemiakov v Československu. (Príspevok k otázke „severného“ stolburu.) [Das Virus der Hexenbesenkrankheit der Kartoffeln in der Tschechoslowakischen Republik. (Ein Beitrag zur Frage des „nördlichen“ Stolburs.)] — Biológia (Bratislava) 11: 449—456, 1956.

Anschrift des Verfassers: Dr. C. Blatný, Biologický ústav ČSAV, odd. fytopatologie, Praha-Dejvice, Na Karlovce 1.

BIOL. PLANT. 1 (4) : 310—327, 1959

Модельные опыты и наблюдения над вирусами из группы акарий (столбур и желтуха) на *Anagallis arvensis* L.

ЦТИБОР БЛАТНÝ

Отдел фитопатологии Биологического института ЧСАН, Прага

Поступило 15 апреля 1959 г.

Резюме

1. У *Anagallis arvensis* L. (*A. a.*) наблюдается очень низкий процент прорастания семян, однако, растение можно легко размножать вегетативным путем и прививать. В случае прививки методом «в бутылку» инкубационный период короток, в самом благоприятном случае он длится 8 дней. Прививка «в крест», т. е. продевание срезанного больного привоя в отверстие в подвое, имеет только теоретическое значение.

2. Цветки здоровых *A. a.* на ночь закрываются. Бахромчатые цветки остаются дольше открытыми. У цветков недоразвитыми венчиками последние не опадают и месяцами остаются открытыми. В наших условиях *A. a.* зацветает в конце мая. В теплицах с 12,5—13 часовым освещением растения цветут до середины октября.

3. Содержание вируса в растениях колеблется в зависимости от онтогенетического развития хозяина и его фотопериодизма. Воспроизведение вируса имеет место только в условиях более чем 12-часового освещения. Вирусы этой группы могут присутствовать в растениях в латентном виде.

4. В окрестностях города Линтовский Градок в Словакии была найдена форма *A. a.* с более мелкими, бурокрасными венчиками. Первые признаки заболевания *A. a.* желтухой появились в наших условиях в конце июня 1957 г., в 1958 г. лишь в конце июля. У больных растений прорастающие семена содержатся только в нижних коробочках развившихся еще до инфекции. Вирусное заболевание может в природе естественным образом влиять на встречаемость *A. a.* *Stellaria media*, *Veronica chamaedrys* и *A. a.* могут служить индикаторами присутствия вирусов и вирусных заболеваний группы акарий (столбур, желтуха, purple-top, yellow-top картофеля). *Stellaria media* как озимое растение, выносящее морозы вплоть до -25° , может служить резервуаром вирусов этой группы.

5. Пролиферация у *A. a.* имеет место в конце сентября до ноября. Сначала она происходит в цветках, потом в листьях.

6. Бахромчатость венчика у *A. a.* может служить одним из первых признаков заболевания желтухой. Бахромчатые цветки, однако, появляются у *A. a.* также при за-

ражении другими вирусами (метельчатость картофеля, green petals клубники, флюдия клевера и *Plantago major*) и у растений больных бактериальным побурением основания стебля. Временно она появляется при прививке здоровых *A. a.* на шпитевидные ростки картофеля, повидимому под действием токсических веществ из чужого подвоя.

7. В случае тяжелого вирусного заболевания растения *A. a.* вообще не цветут, сильно ветвятся и вместо цветков образуют розетки листьев. Сужение и волнистость листьев, также как и появление в листьях антоциана не всегда являются характерными признаками заболевания вирусной желтухой. Привой из больного растения *A. a.* не вызвал у *Nicotiana glutinosa* никаких признаков заболевания, повидимому вследствие быстрой гибели привоя в результате сильной интоксикации. Прививка больных растений *A. a.* на молодые семенные растения картофеля влечет за собой образование у последнего нерассеченных листьев, длинных, тонких стеблей и развитие надземных, отчасти мягких клубеньков с шпитевидными ростками. В нескольких случаях наблюдались признаки заболевания yellow-top. Побеги, развивающиеся из этих шпитевидных ростков после прививки на томат вызывают у последнего усиленное ветвление и недоразвитие цветочных почек, реже также недоразвитие и позеленение венчиков (псевдоклассический столбур). Прививка побегов метловидного картофеля на *Anagallis linifolia* L. вызывает у последней лишь образование более мелких и бледных венчиков.

8. Воспроизведение вируса в растениях, согласно нашим опытам по прививке больных *A. a.* на здоровый подвой *A. a.*, имеет место в условиях освещения продолжительностью не менее 12,5 часов. Размножение вируса, таким образом, связано с повышенным образованием белков в период подготовки хозяина к цветению. Количество вируса в растениях в зимний период может падать, судя по габитусу растений, вплоть до нулевого уровня (также как и в одуванчике, клубнях картофеля, в выюнке, в *Cynanchum vincetoxicum*). У *Stellaria media* колебания в содержании вируса незначительны. Это растение зацветает только в условиях 8,5 часового и более продолжительного светового дня.

9. Цикадофильные вирусы хорошо приспособлены к своим переносчикам, выживают в их теле и часто передаются трановариально, не переносятся механическим путем). Наоборот, эти вирусы мало приспособлены к своим растениям-хозяевам (повреждают их, механически не переносятся, их содержание сильно колеблется в зависимости от онтогенетического развития и фотопериодизма растения). Поэтому цикадофильные вирусы этой группы можно считать первоначально животными вирусами, которые только вторично перешли на растения.

BRIEF COMMUNICATION

**Problems of Autosterility in *Nicotiana alata* LINK et OTTO
(Formation of the inhibitory factor in the pistil)**

JARMILA TOMKOVÁ

Department of Genetics, Faculty of Biology Charles University, Praha

Received June 1, 1959

Souhrn: Práce je zaměřena zvláště na řešení otázky, zda je u autosterilního druhu *Nicotiana alata* LINK et OTTO var. *grandiflora* COMES inhibiční složka vytvářena nezávisle na opylení, nebo vzniká-li až vlivem působení prorůstajících inkompatibilních pylových láček. Otázka byla řešena pomocí umělé kultivace pylu na agarových filmech zčásti pokrytých roztěry pestíkových pletiv. Pestíky byly před preparací buď opyleny kompatibilně nebo inkompatibilně, nebo ponechány bez opylení. Mezi pestíkovými pletivy (v nichž sterilizační reakce buď proběhla, nebo neproběhla) a klíčovím pylem, byla vyséváním pylu buď téhož nebo rozdílného genetického původu na preparátech improvizována obdoba inkompatibilních nebo kompatibilních vztahů. Z výsledků vyvozuje autorka předběžný závěr, že je inhibiční složka v pestíku pravděpodobně přítomna již před opylením.

Summary: From the partial results of artificial cultures in the presence of pistil tissue-pulp the author draws the preliminary conclusion that the inhibitory factor in the pistil of *Nicotiana alata* LINK et OTTO is already present before pollination.

These questions were investigated by means of artificial cultivation of pollen tubes on agar in the presence of compatible and incompatible pulped pistils which had been previously prepared in various ways.

This report gives the results of the last series of experiments (part A in the scheme). In the series of earlier experiments no signs of any marked inhibition were recorded.

Material and Methods. Pollen and pistils of the autosterile species *Nicotiana alata* LINK et OTTO var. *grandiflora* COMES were used.

I. Preparation of the pistil pulp: in each case three washed and dried pistils were deprived of their stigmas (which might contain substances stimulating pollen-tube growth) and nectaries (because of high content of carotenoids). They were then quickly pulped in a mortar with one drop of distilled water. The pulp was immediately transferred to glass plates covered with thin agar films (1.5% agar). The required pollen was immediately scattered on the pulp and the surrounding agar (for control), and the plates were placed in damp chambers and left for 16 to 18 hours at a temperature of about 20° C.

II. Three days before the experiment the pistils used for the preparations were a) pollinated incompatibly, b) compatibly, c) left unpollinated. Pollen scattered on the pulp from these pistils was: A. incompatible (from the same plant as the pistils), B. compatible (from a plant of a different genotype than the pistils). The arrangement of the experiments is shown in the table.

III. Evaluation of the preparations was carried out twice: in the fresh state, and following fixation and staining, which made it easier to distinguish the objects under observation from the pulp. The evaluation was made by comparing the lengths of the tubes with the pollen grain diameter, according to a given scale of inhibition grades.

The preparations: fixation in 70% alcohol, following complete drying stained for 1½ minutes in 0.25% safranin solution in 70% alcohol; staining completed by brief immersion in 1% aqueous aniline blue solution. The bright purple-stained pollen grains with dark blue tubes stood out in the bluish-stained pollen tissue pulp. Preparations preserved by covering with a kopolymere film (methylmetakrylate), or by normal mounting in Canadian balsam.

Results. Considerable inhibition was exhibited in the main sector of the experiment, series A, in its variants b (in 61.11% cases) and c (53.33%), in var. a) 10.50% cases of inhibition only.

Its frequency in variant b) is significantly higher than in variant a): $\chi^2 = 10.397$, the probability of the occurrence of the observed difference in a homogeneous population is only about 2%; the frequency of inhibition in variant c) is almost significantly higher than in variant a): $\chi^2 = 7.401$, with probability of occurrence of that difference being in the region of 5% significance limit. Thus inhibition of the growth of pollen tubes is exhibited in variants b) and c).

Experimental scheme							
Pulp from pistils of plant 1.		Series A B		Pulp from pistils of plant 2.		Series B A	
		Pollen from plant				Pollen from plant	
var.	pistil:			pistil:			
a	pollinated with incomp. pollen (from plant 1)	1	2	pollinated with incomp. pollen (from plant 2)		1	2
b	pollinated with comp. pollen (from plant 2)	1	2	pollinated with comp. pollen (from plant 1)		1	2
c	unpollinated	1	2	unpollinated		1	2

BIOL. PLANT. 1 (4) : 328—329, 1959

К проблеме автостерильности у *Nicotiana alata* LINK et OTTO (Образование ингибиционного начала в пестике).

ЯРМИЛА ТОМКОВА

Отдел генетики Биологического факультета Карлова Университета, Прага

Поступило 1. июня 1959 г.

Резюме

На основании данных опытов по искусственному проращиванию пыльпы в присутствии растертых тканей пестиков автор делает предварительное заключение о том, что фактор несовместимости находится в пестике *Nicotiana alata* LINK et OTTO var. *grandiflora* COMES еще до опыления и от последнего не зависит.

Address: Jarmila Tomková, Prom. Biol., Genetický ústav, Biologická fakulta University Karlovy, Viničná 5, Praha 2.

BRIEF COMMUNICATION

Transmission of Beet Mosaic Virus by the Green Peach Aphid Starved before Infection Feeding under Different Conditions of Air Humidity

JAROSLAV BRČÁK

Department of Plant Pathology, Biological Institute, Czechoslovak Academy of Sciences, Praha

Received June 22, 1959

Souhrn: Mšice (*Myzodes persicae* SULZ.), které hladověly 2 hodiny před pětiminutovým po-
bytem na zdroji infekce ve vzdušné vlhkosti 0%, 34%, 56% přenesly virus mosaiky řepy ve
větším podílu než mšice, které před infekčním sáním hladověly ve vlhkosti 80% a 100%.

Summary: Aphids (*Myzodes persicae* SULZ.) were subjected to infection feeding after starva-
tion for two hours, in varying air humidities. Infection feeding lasted for five minutes. The
aphids which were starved under conditions of 0%, 34% and 56% air humidities transmitted
the virus to a greater extent than those kept at humidities of 80% and 100%. (At the relative
humidity of 0% there was a slight decrease of infectivity, probably due to reduced activity of
the aphids). The phenomenon may be explained by the fact that when denied food in a dry
atmosphere the aphids lose more water than in a humid atmosphere and hence their rate of
feeding when on the source of infection is more rapid, which tends to increase the number of
infected individuals. This finding is regarded as having a practical significance.

Introduction: The common phenomenon of the increased efficiency of the vector of a non-
persistent virus when it is starved previous to a short period of infection feeding, has been con-
firmed for the beet mosaic virus more than once (SYLVESTER 1947). In the present experiments
the influence of air humidity on the transmission of beet mosaic was followed during the period
when the aphids were starved previous to the short infection feeding. GILYAROV (1949) has
demonstrated experimentally that the amount of food taken by aphids is connected with the
replacement of water loss in a dry atmosphere. The fact that aphids lack the rectal glands,
which in other insects extract water from the contents of the intestines before defecation, tends
to support his assumption. In the present experiments it was assumed that out of a certain
number of aphids starved under conditions of different air humidities there would be, following
transmission to the source of infection, varying degrees of effort to make up for water loss by
feeding. Thus the degree of infection of aphids in the different groups, which were exposed to
infection feeding for limited periods, would also vary.

Material and Methods: Healthy sugar beet seedlings were used as the test plants. The source
of infection was a sugar beet plant artificially infected with a strain of beet mosaic virus. The
aphids (anholocyclic glasshouse form) were kept on healthy tobacco plants. Only apterous
females were taken for the experiments. The hygrometers were constructed according to ZWÖLFER
(1932); the 12 × 10 cm. glass cylinders with ground glass covers were filled up to $\frac{1}{3}$ with salts
(dry, or saturated solutions). A construction of glass rods was placed on the bottom of the
cylinder, reaching about 1 cm. above the surface of the solution. Glass cylinders measuring
4 × 4 cm., containing the aphids and closed at both ends by silon nets, were placed on this
construction. The following chemicals were used for maintaining the different air humidities:

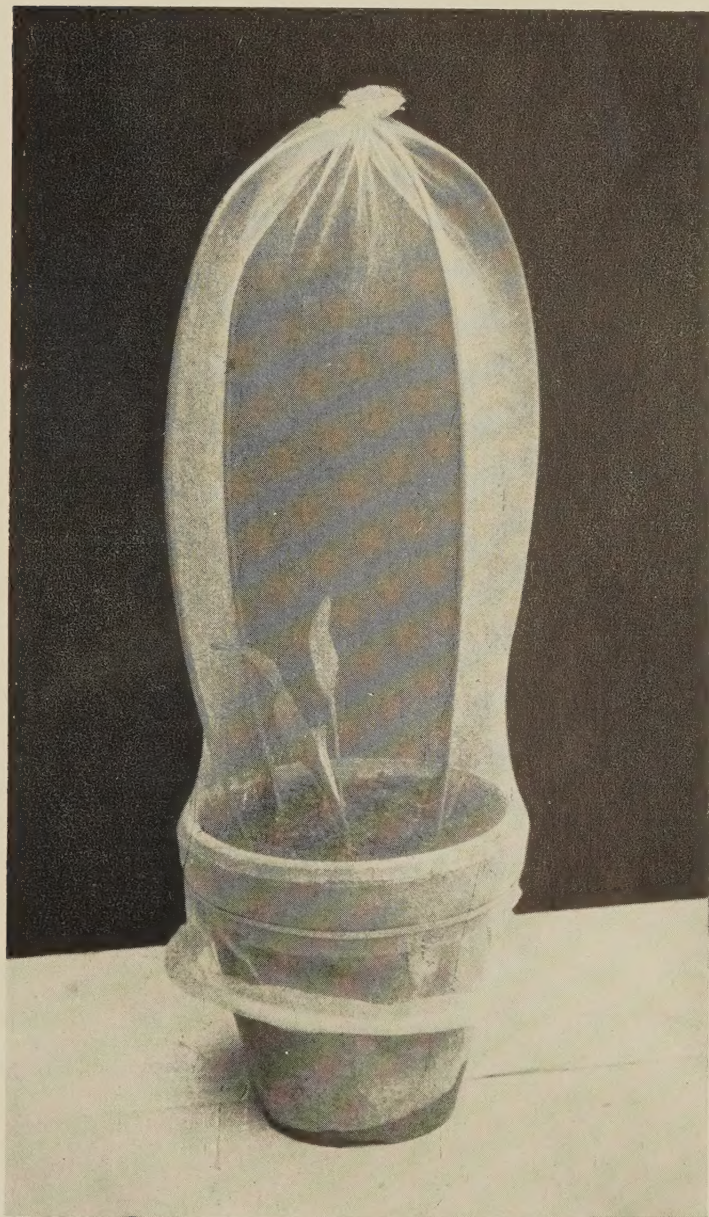


Fig. 1. Silon isolator. Two stainless metal wires are thrust cross-wise into the soil in the flower pot. The construction is covered from above by a silon stocking and closed by tying. (Orig. J. Brčák.)

CaCl_2 sicc., $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, NH_4Cl , and H_2O . Following the starvation of the aphids in the hygrometers an infected sugar-beet leaf, which had been cut immediately before use, was put into the cylinder. The aphids were transferred from the source of infection by means of a moistened camel's hair brush to sterile Petri dishes and from them to the test plants which were enclosed in specially constructed silon isolators (fig. 1). On the day after the transfer the aphids were killed with Ekatine on the test plants and the isolators were removed.

The experiment with five degrees of humidity was carried out four times in all (twice at the end of May and twice at the end of August) in 1955 and 1957. For each degree of humidity 37–40 test plants were used and two aphids were placed on each plant. A total of 194 test plants and 388 aphids were employed in these experiments.

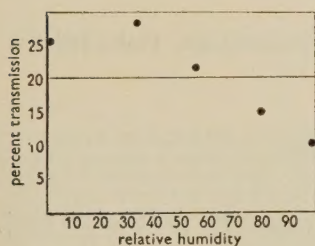


Fig. 2.

ties. The difference in the total number of cases of infection above and below the average (i. e. 20.1%) is statistically significant: χ^2 4.6 for one degree of freedom, $P < 0.04$.

Prolonged starvation under dry conditions had an unfavourable effect on the activity of the aphids. This was particularly the case in the experiment at 28.6° C in which aphids starved for 310 min. at 0%, 32%, 49%, 77%, and 100% relative humidities infected 11%, 66%, 28%, 20%, and 11% of the test plants.

When the use of pairs of aphids is taken into account the over-all average number of cases of infection (20.1%) is roughly one-half of that which would be anticipated from KvičALA's (1947) results obtained in experiments with similar time intervals. It is possible that the relatively long period of post-infection feeding starvation had an unfavourable effect. [SYLVESTER (1952) found that a reduction in the infectivity of aphids begins to appear after 5 min.] SYLVESTER's results (1949, 1952, 1956) indicate that infection feeding is most important during the first 15 seconds and that the prolongation of this period by 5 minutes has no real significance. According to SYLVESTER, the maximum transmission efficiency can be achieved after 15 min. starvation prior to infection feeding. The start of infection feeding is taken to be the moment when the aphid's stylets penetrate the leaf tissues. In our case, however, the aphids were kept on the source of infection for a limited period of time. It is assumed that in this case relative humidity mainly influenced the efforts of the aphids to make up for water loss by feeding following their transmission to a new source of food. [SYLVESTER (1949) found no differences in his experiments as regards the influence of dry and humid conditions on the infectivity of aphids during post-infection feeding starvation.]

The phenomenon demonstrated in the present paper is considered to have practical significance. It may concern the effect of the weather and the plant cover climate, and it may also be connected with the spread of other economically important viruses.

References

- GILYAROV, M. S.: Osobennosti pochvy kak sredy obitaniya i ee znachenie v evolyucii nasekomykh [The properties of soil as environment and their significance in the evolution of insects]. — Izd. AN SSSR Moskva-Leningrad, 1949.
- KvičALA, B. A.: Studies on the relationship between some aphids and the sugar beet mosaic virus (Beta virus 2). — Acta Univ. Agr. et Silvicult. Brno RČS, C 38, 44 pp., 1947.

- SYLVESTER, E. S.: Influence of fasting in the transmission of the beet mosaic virus by the green peach aphid. — *Phytopathology* **37** : 528—530, 1947.
- SYLVESTER, E. S.: Beet-mosaic virus — green peach aphid relationships. — *Phytopathology* **39** : 417—424, 1949.
- SYLVESTER, E. S.: Comparative transmission of beet-mosaic virus by four aphid species. — *Phytopathology* **42** : 252—254, 1952.
- SYLVESTER, E. S.: Beet mosaic and beet yellows virus transmission by the green peach aphid. — *J. Amer. Soc. of Sugar Beet Technologists* **9** : 56—61, 1956.
- ZWÖLFER, W.: Methoden zur Regulierung von Temperatur und Luftfeuchtigkeit. — *Zeitschr. angew. Entomol.* **19** : 497—513, 1932.

Address: RNDr. Jaroslav Brčák, Biologický ústav ČSAV, odd. fytopatologie, Praha-Dejvice, Na Karlovce 1.

BIOL. PLANT. 1 (4) : 330—332, 1959

Перенос вируса мозаичной болезни свеклы тлями (*Myzodes persicae* SULZ.),
голодавшими перед питанием
на источнике инфекции в условиях разной влажности воздуха

ЯРОСЛАВ БРЧАК

Фитопатологический отдел Биологического института ЧСАН, Прага

Поступило 22. июля 1959 г.

Резюме

Тли *Myzodes persicae* SULZ. содержались два часа без пищи в условиях разной влажности воздуха, после чего их помещали на пять минут на источник инфекции. Тли, голодавшие в условиях относительной влажности воздуха в 0%, 34% и 56%, переносили вирус в большем масштабе, чем тли, голодавшие перед питанием на источнике инфекции в условиях 80- и 100-процентной влажности. Различие статистически показательно. (При 0-процентной относительной влажности воздуха имеет место некоторое снижение способности к переносу инфекции, что, по видимому, связано со снижением активности тлей). Описанное явление можно объяснить тем, что при голодании в сухой среде тли теряют больше воды и в связи с этим при пребывании на источнике инфекции они быстрее начинают питаться, вследствие чего также повышается количество инфекционных особей. Автор считает, что это явление имеет практическое значение.

BIOLOGIA PLANTARUM — Издаётся Биологическим институтом Чехословацкой Академии Наук в Издательстве ЧСАН, Прага II., Водичкова 40. — Выходит 4 раза в год. Подписная цена на 1 год Kčs 30,—, цена одного номера Kčs 7,50. — Адрес редакции: Biologický ústav ČSAV, Na cvičišti 2, Praha 6. — Заказы: Artia, Smečky 30, Praha 2, Československo. — Типография: Knihtisk, n. p. závod 4, Praha 13, Šámová 12.

Issued by Biologický ústav Československé akademie věd. Yearly subscription (4 numbers) Kčs 30,—. Single number Kčs 7,50. — Address: Biologický ústav ČSAV, Na cvičišti 2, Praha 6. Orders: Artia, Smečky 30, Praha 2, Czechoslovakia.

Zájemcům v ČSR dodá Poštovní novinový úřad, Jindřišská 14, Praha 3.